
*AUS DEM LEHRSTUHL FÜR AUGENHEILKUNDE
PROF. DR. HORST HELBIG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*OBERFLÄCHENEXPRESSION DES
TRPV2-KANALS IM RETINALEN PIGMENTEPITHEL*

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades für Medizin
der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Frederik Wilhelm Fried

2017

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thorsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Horst Helbig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Wetzel

Tag der mündlichen Prüfung: 12.09.2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Das Retinale Pigmentepithel (RPE)	3
1.2	Aufbau und Struktur des RPE	3
1.3	Funktionen des RPE	5
1.4	Sekretion	8
1.5	Steuerung von Ionenkanälen - <i>Gating</i>	9
1.6	Oberflächenexpression von Ionenkanälen	11
1.7	TRP-Kanäle	12
1.8	Zielsetzung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Zellkultur	19
2.2	Patch Clamping	21
2.3	Lösungen und Chemikalien	30
3	Ergebnisse	32
3.1	Kontrollexperimente	33
3.2	Hitze induzierte Ströme in ARPE19-Zellen	35
3.3	Pharmakologie der Hitze induzierten Ströme	39
3.4	PI3-Kinase abhängige Hitze ströme	44
3.5	Cannabidiol induzierte Ströme in ARPE19-Zellen	47
3.6	Pharmakologie der Cannabidiol induzierten Ströme	51
3.7	Induziert Cannabidiol PI3-Kinase abhängige Ströme?	54
3.8	IGF-1 induzierte Ströme in ARPE19-Zellen	57
3.9	Pharmakologie der IGF-1 induzierten Ströme	62
3.10	Quervergleich Hitze - IGF1	66
3.11	Quervergleich IGF1 - Cannabidiol	67
3.12	Quervergleich LY-Wirkung	68
4	Diskussion	69
4.1	Untersuchungsziel	69

4.2	Vorgehensweise	69
4.3	Einzelergebnisse	70
4.4	Regulationsmechanismen	74
4.5	Klinische Vernetzung	88
4.6	Zusammenfassung	89
5	Anhang	103
5.1	Abkürzungsverzeichnis	103
5.2	Danksagung	105
5.3	Publikation	106
5.4	Erklärung	107

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Das Retinale Pigmentepithel (RPE)

Das Retinale Pigmentepithel ist ein einschichtiges Epithel und bildet einen Teil der Blut-Retina Schranke. Es ist wichtig für die Entwicklung, die Funktion und den Erhalt der Retina und essenziell für den Sehvorgang. Zudem reguliert es die Interaktion zwischen Retina und Choriokapillars.

1.2 Aufbau und Struktur des RPE

Das Retinale Pigmentepithel (*RPE*) ist ein einschichtiges, kuboidales, pigmentiertes Epithel. Die Pigmentepithelzellen besitzen einen apikalen und einen basalen Pol. Der apikale Pol der retinalen Pigmentepithelzellen grenzt an die Photorezeptoren, der basale an die Bruch'sche Membran. Der apikale Pol ist charakterisiert durch Mikrovilli. Die Vielzahl an Mikrovilli ermöglicht es den retinalen Pigmentepithelzellen, dass sie ihre Oberfläche vergrößern und dergestalt eine größere Austauschfläche zwischen ihnen und den Photorezeptoren zu schaffen [116, 14].

Eine direkte zelluläre Verbindung, zwischen dem RPE und den Photorezeptoren, gibt es nicht. Zwischen ihnen liegt der sogenannte *interphotoreceptor space*. In diesem befindet sich die *interphotoreceptor matrix*, über die der Stoffaustausch zwischen dem RPE und den Photorezeptoren stattfindet. Die *interphotoreceptor matrix* wird vom RPE gebildet. Sie hat wichtige Funktionen nicht nur in Bezug auf den Stoffaustausch zwischen dem RPE und den Photorezeptoren, sondern auch auf deren Adhäsion und die Phagozytose der äußeren Segmente durch das RPE [45, 116].

An seiner basalen Seite grenzt das RPE an die Bruch'sche Membran. Die Bruch'sche Membran trennt das RPE vom fenestrierten Endothel der Choriokapillaris. Die drei Strukturen bilden zusammen die Blut-Retina-Schranke. Die Schrankenfunktion wird v.a. durch Zonula Occludens (*tight junctions*) zwischen den RPE-Zellen gewährleistet

[51, 116]. Durch die *tight junctions* bilden sie ein funktionell dichtes Epithel, sodass lediglich ein (hochselektiver) transzellulärer Transport möglich ist.

Die Struktur des RPE ist nicht homogen. Je nach Lokalisation in der Retina (*Macula lutea* - *Peripherie*) kann die Zellmorphologie variieren: Im Bereich der Macula lutea sind die Zellen sowohl höher als auch schmäler im Vergleich zur Peripherie der Retina. Die Menge und Zusammensetzung (*Melanin*, *Lipofuszin*, *Melanolysosomen*) der Zellen ist von der Region abhängig [51, 15, 36]. Ein weiterer Faktor, der die Morphologie des Epithels stark beeinflusst, ist das Alter. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass die Zellen des RPE nicht teilungsfähig sind. Bei zunehmenden Alter treten daher charakteristische Veränderungen auf: Unter anderem kommt es zum Verlust von Melanin und zur Akkumulation von Lipofuszingranula. Auch die antioxidative Funktion des RPE reduziert sich im Verlauf des Lebens. Die genannten Veränderungen können die Entstehung von Erkrankungen, wie bspw. der altersbedingten Makuladegeneration, begünstigen [15, 36, 98, 92].

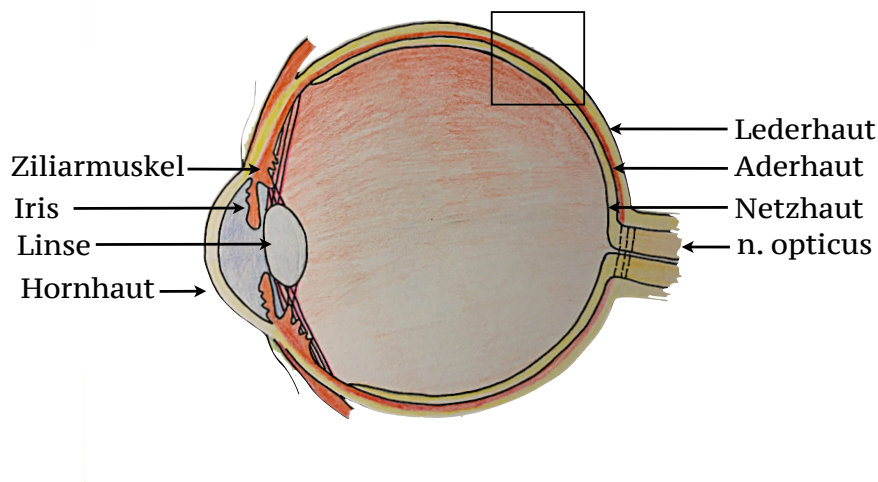


Abbildung 1.1: Schematische Abbildung der Anatomie des Auges. Abbildung 1.2 stellt vergrößert das mittels schwarzem Rechteck markierte Areal dar.

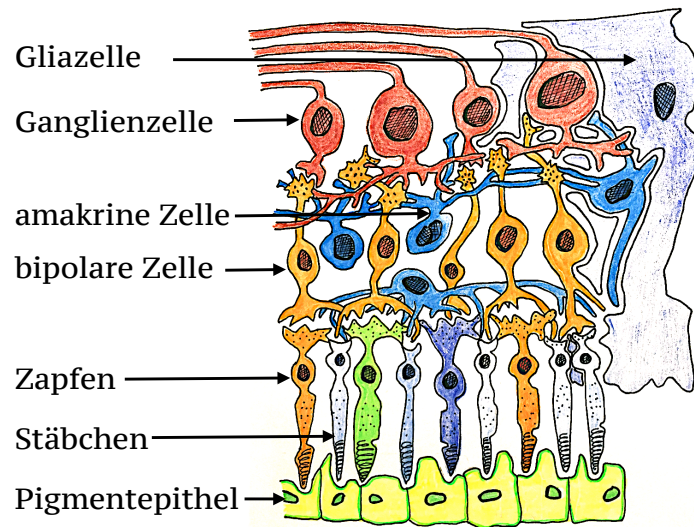


Abbildung 1.2: Schematische Abbildung der Netzhaut. Einfallendes Licht durchquert die gesamte Netzhaut, bevor es durch die retinalen Pigmentepithelzellen resorbiert wird. Das RPE steht in enger räumlicher Beziehung zu den Stäbchen und Zapfen der Netzhaut.

1.3 Funktionen des RPE

Das RPE sorgt mit Hilfe von diversen Mechanismen für die Aufrechterhaltung der retinalen Funktion. Pathologische Veränderungen können daher zu einer starken Einschränkung des Visus und im schlimmsten Fall zum Sehverlust führen (s. 1.3) [15, 116, 114, 14, 78, 6, 130].

- Lichtabsorption und Oxidationsschutz

In das Auge einfallende Licht wird durch die Linse gebündelt und fällt auf die Retina. Dadurch ist insbesondere die Macula hohen thermischen Energien ausgesetzt. Die Choriokapillaris gehört zu den am besten durchbluteten Geweben im menschlichen Körper ($1,400 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{ g Gewebe}^{-1}$).

Allerdings führt die Kombination aus der hohen Sauerstoff-Sättigung, hohen thermischen Energiemengen durch einfallendes Licht und der hohen Stoffwechselrate (z.B. durch Phagozytose) zu starkem *oxidativem Stress*. Dabei entstehen freie Radikale, die zur Schädigung verschiedener Strukturen/Moleküle (Proteine, DNA, etc.) führen.

Jedoch ist das RPE dazu in der Lage, diesen *oxidativen Stress* zu reduzieren. Es besitzt verschiedene Pigmente, die Licht unterschiedlichster Wellenlängen absorbieren. Durch Antioxidantien, z.B. Enzyme (Superoxid-Dismutase/ Katalase

oder andere Substanzen (*Vit C, Vit E, Carotenoide*), können freie Radikale gebunden werden [5, 68, 67]. Durch zelleigene Reparaturmechanismen können Lipide, DNA und Proteine wiederhergestellt werden [15, 116].

- Transepithelialer Transport

Da das RPE die äußerste Begrenzung der Blut-Retina-Schranke ist, reguliert es den Transport verschiedener Moleküle vom Blut in die Retina sowie in umgekehrter Richtung. Anhand von zwei Beispielen soll dies näher erläutert werden: (1) Durch die hohe metabolische Stoffwechselrate in der Retina entsteht dort eine große Menge H_2O . Aufgrund des hohen Augeninnendruckes kommt es zu einem Ausstrom von H_2O aus dem Glaskörper in die Retina. Beides bedingt, dass das H_2O , welches sich zuletzt im *interphotoreceptor space* befindet, durch das RPE (über Aquaporine) in den Blutkreislauf zurückgeführt werden muss [116].

(2) In Umgekehrter Richtung transportiert das RPE bspw. Glucose vom Blut in die Retina. Daher befindet sich eine hohe Anzahl an GLUT-1 und GLUT-3 Transportern in der apikalen und basalen Zellmembran [116, 7, 2].

- Phototransduktion und Retinal-Stoffwechsel

Durch die Linse gebündeltes Licht fällt auf die Retina. In den Photorezeptoren werden Photonen durch ein Derivat des Vitamin A (*11-cis-Retinal*) absorbiert. Das *11-cis-Retinal* ist an ein Transmembranprotein (*Opsin*) gebunden, welches sich in den Disks der äußeren Segmente befindet. Die aufgenommene Energie führt zur Isomerisierung des *11-cis-Retinal* zum *all-trans-Retinal*. Dadurch kommt es zur Konformationsänderung des Opsins in Metarhodopsin II, welches die photoelektrische Transduktion in Gang setzt. Das *all-trans-Retinal* muss nun wieder in das cis-Isomer überführt werden, um erneut an das Opsin binden zu können und die Kaskade von Neuem beginnen zu lassen [116, 13, 14, 106]

- Phagozytose

Wie bereits erwähnt, ist die Retina durch einfallendes Licht hohen Mengen an Energie ausgesetzt. Dies führt zur Entstehung freier Radikale und Schädigung zellulärer Strukturen. Teilweise können diese Schäden kompensiert werden (s.o.). Im Laufe der Zeit kommt es dennoch zur Akkumulation geschädigter Zellstrukturen, vor allem in den äußeren Segmenten der Photorezeptoren. Um die Funktionsfähigkeit der Photorezeptoren zu gewährleisten, werden daher die äußeren Segmente stetig erneuert. Es kommt zur Abstoßung des äußeren Segments. Das abgestoßene Segment wird über verschiedene Rezeptoren (z.B. $\alpha_V\beta_5$ -*Integrin*, *MerTK*, *CD36*) vom RPE erkannt und phagozytiert. Das entstandene Phagosom verschmilzt mit kleineren Lysosomen. Zusammen bilden sie das Phagolysosom.

Dieses zersetzt die aufgenommenen Bestandteile [116, 14, 6, 130].

- Sekretion

Wie anhand der zuvor dargestellten Beispiele zu erkennen ist, findet eine wechselseitige Beeinflussung zwischen Photorezeptoren und RPE statt. Dabei sind Wachstumsfaktoren von zentraler Bedeutung. Das RPE ist in der Lage eine Vielzahl an Faktoren zu sezernieren u.a. TGF- β , IGF-1, PEDF, VEGF [131, 116]. Wegen ihrer Bedeutung sollen zwei vasoaktive Faktoren (PEDF und VEGF-A) kurz hervorgehoben werden:

PEDF (*pigment-epithelium-derived-factor*) scheint auf zweierlei Art und Weise die Struktur der Choriokapillaris und der Retina zu stabilisieren [116, 113, 62, 33]. Einerseits scheint es (zell-)protektiv zu wirken: In Neuronen konnte es die hypoxie-induzierte Apoptose verhindern [116, 19, 88, 113]. Andererseits wirkt es auf die Choriokapillaris anti-angiogen, da es die Proliferation von Endothelzellen verhindert [33, 62, 89]. PEDF wird vor allem an der apikalen Seite der RPE-Zellen sezerniert [91, 116].

Der zweite Wachstumsfaktor ist VEGF-A (*vascular-endothelial-growth-factor*). VEGF-A wird von Zellen (bspw. RPE-Zellen) konstant sezerniert. VEGF-A fördert unter anderem die Vaskulo- und Angiogenese. Zudem sorgt eine konstante VEGF-A Sekretion für eine Stabilisierung der Endothel-Fenestrierung. Wenn Zellen unter Hypoxie leiden, so kommt es zu einer vermehrten Sekretion von VEGF-A, welche die Blutversorgung des entsprechenden Gewebes verbessert [108, 116]. Im Gegensatz zu PEDF, wird es vom RPE überwiegend über die basale Membran sezerniert. Im Auge hat es starken Einfluss auf die Struktur der Choriokapillaris. Dabei wirkt es antiapoptotisch und erhöht die Permeabilität der Gefäßwand, indem es Endothel-Fenestrations stabilisiert [101, 16, 116]. Allerdings kann eine gestörte VEGF-A Sekretion auch zu pathologischen Veränderungen führen. In der Retina ist dies bspw. beim Krankheitsbild der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) der Fall. Eine der charakteristischen pathologischen Veränderungen sind die bei der AMD entstehenden chorioidalen Neovaskularisationen (CNV). Diese entstehen aus kleinen Gefäßausprossungen der Choriokapillaris. Die Sprossen durchbrechen die Bruch'sche Membran und breiten sich unter dem retinalen Pigmentepithel aus. Hierbei differenzieren sie sich solange, bis ein arteriovenöses Gefäßkonvolut entsteht. Im weiteren Verlauf können sie dabei auch das Pigmentepithel durchbrechen und in die innere Retina einwachsen. CNVs scheinen aufgrund einer pathologisch gesteigerten Sekretion von VEGF-A zu entstehen [63, 128, 38, 75, 76, 83].

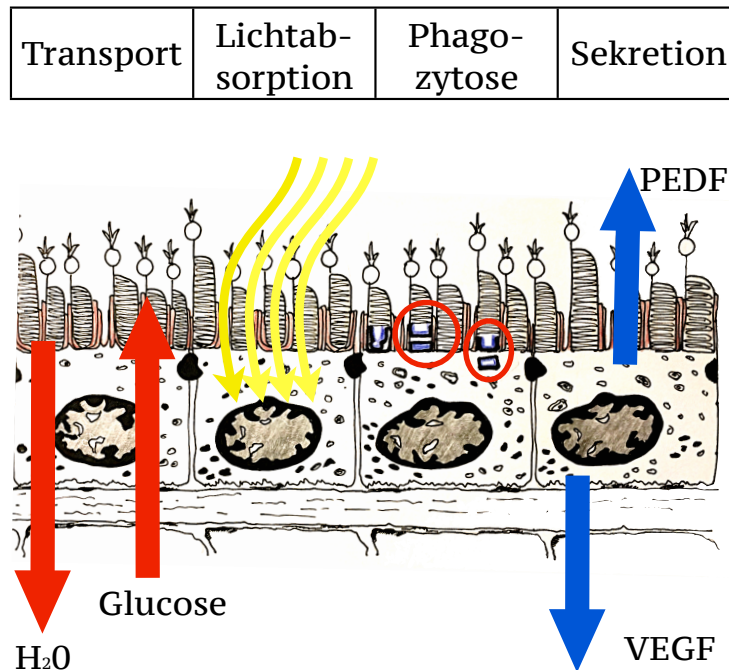


Abbildung 1.3: Schematische Abbildung der unterschiedlichen Funktionen des retinalen Pigmentepithels. Angelehnt an [116].

1.4 Sekretion

Die Sekretion von bspw. Wachstumsfaktoren durch eine Zelle kann durch verschiedene *Signale* hervorgerufen werden. In vielen Fällen sind dabei Ionenkanäle involviert. Dies soll im folgenden Abschnitt anhand der Sekretion von VEGF-A durch das RPE näher erläutert werden:

Eines der oben genannten *Signale* sind bspw. die systemischen Hormone. Dazu zählen u.a. die Peptid- und Steroidhormone. Steroidhormone können aufgrund ihrer lipophilen und hydrophoben Eigenschaft die Zellmembran passieren. Im Zytosol/Zellkern binden sie an intrazelluläre Rezeptoren und führen zu einer vermehrten Transkription/Expression von Genen. Peptidhormone können aufgrund ihrer lipophoben und hydrophilen Eigenschaft nicht durch die Zellmembran diffundieren. Sie setzen über membranständige Rezeptoren eine Signalkaskade in Gang, die zur Freisetzung von *Second Messenger* führt. Beispiele für *Second Messenger* sind intrazelluläres Ca^{2+} , cGMP, cAMP und IP_3 . Ein Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} als *Second Messenger* wird meist durch eine vermehrte Aktivität von Ca^{2+} -Kanälen in der Zellmembran hervorgerufen [64].

Im RPE führt intrazelluläres Ca^{2+} als *Second Messenger* unter anderem zu einer ver-

mehrten Freisetzung des Wachstumsfaktors VEGF-A [31]. Dieser intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg kann auf verschiedene Wege hervorgerufen werden: Einerseits über den basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (*bFGF*). Der bFGF bindet an den FGFR-2 (*fibroblast-growth-factor-receptor 2*) und steigert die maximale Leitfähigkeit von L-typ Ca^{2+} -Kanälen in der Zellmembran von RPE Zellen. Gleichzeitig senkt er deren Erregungsschwelle. Dadurch kommt es zum Einstrom von Ca^{2+} und in der Folge zur Sekretion von VEGF-A [117, 103, 104].

Ein weiterer Kanal, dessen Aktivität einen Ca^{2+} -Einstrom in RPE Zellen hervorruft, ist der TRPV2-Kanal. Dieser kann ebenso über ein Peptidhormon aktiviert werden, nämlich IGF-1 (*insulin-like-growthfactor-1*). IGF-1 bindet an den IGF-1-Rezeptor (Tyrosin-Kinase Rezeptor)[111, 102]. Daraufhin kommt es zur Phosphorylierung verschiedener Proteine (z.B. IRS - *insulin receptor substrate*, Shc - *SH2 domain-containing-protein*). Diese setzen zwei Signalwege in Gang, nämlich den PI3- (*Protein-Kinase-3*) und MAPK- (*Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase*) Signalweg [43]. Nach Aktivierung der PI3-Kinase phosphoryliert diese den Hypoxie-induzierten-Faktor α und stabilisiert ihn dadurch. HIF- α ist ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem die Bildung von Erythropoietin und VEGF-A fördert [55].

1.5 Steuerung von Ionenkanälen - *Gating*

Die Leitfähigkeit von Ionenkanälen kann auf verschiedene Arten reguliert werden. Dabei spielen sowohl direkte Signale, als auch die Zusammensetzung des intra- und extrazellulären Raums eine Rolle [49].

- Spannungsabhängige Ionenkanäle

Eine große Gruppe von Ionenkanälen wird durch das Membranpotential gesteuert. Die Lage des Membranpotentials ergibt sich aus der Verteilung elektrischer Ladung im intra- und extrazellulären Raum. Kommt es nun zu Veränderungen dieser Ladungsverteilung, so verändert sich auch das Membranpotential der Zelle. Diese Veränderung geht mit einer Veränderung des elektrischen Feldes einher. Dies kann zu einer Konformationsänderung geladener Untereinheiten von Ionenkanälen führen, die dadurch aktiviert werden [22]. Die β -Zellen des Pankreas sind ein populäres Beispiel für einen derartigen Steuerungsmechanismus [48]: Vereinfacht führt ein Anstieg an intrazellulärer Glucose auch zu einem Anstieg an intrazellulärem ATP, welches ein direkter Metabolit der Glykolyse ist. Durch den Anstieg an ATP kommt es zur Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit ATP-abhängiger K^+ -Kanäle. Dies wiederum führt zur Depolarisation der

β -Zelle. Durch die Depolarisation kommt es zur Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen und zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zur Insulin-Sekretion.

- Ligand-gesteuerte Ionenkanäle

Die nächste große Gruppe umfasst Ionenkanäle, die durch Binden eines Liganden aktiviert werden können. Auch hier soll ein populäres Beispiel zur Veranschaulichung herangezogen werden: Die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren. Der Name verrät bereits, dass diese Art der Rezeptoren durch Acetylcholin oder Nikotin aktiviert werden können. Besondere Bedeutung kommen diesen Rezeptoren bei der Weiterleitung von Aktionspotentialen in Synapsen zu. Dies soll kurz erläutert werden: Präsynaptisch kommt es durch ein Aktionspotential zur Depolarisierung der Zelle und zum Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zur Sekretion von Acetylcholin aus präsynaptischen Vesikeln. Nach Diffusion des Acetylcholins über den synaptischen Spalt, bindet sich dieses an die extrazelluläre Domäne des Acetylcholinrezeptors. Dies führt zur Konformationsänderung des Acetylcholinrezeptors - von einem geschlossenen in einen offenen Zustand. Im offenen Zustand strömt durch den Acetylcholinrezeptor Na^+ in die Zelle und K^+ aus der Zelle, sodass die Zelle depolarisiert [60, 64, 120].

- Temperaturabhängige Ionenkanäle

Eine weitere große Gruppe umfasst die Ionenkanäle, die durch Temperaturveränderungen reguliert werden. Hierzu zählen insbesondere die TRP-Kanäle (*transient receptor potential channels*). Diese sind eine heterogene Gruppe transmembranaler Proteine. Sie werden in vielen verschiedenen Geweben und Zelltypen exprimiert. Dabei erfüllen sie unterschiedlichste Aufgaben. Ihre Aminosäuresequenz ist sehr ähnlich. Zudem sind sie besonders in sensorischen Organen aktiv. So führen beispielsweise Temperatursteigerungen auf $>43^\circ\text{C}$ zur Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit von TRPV1-Kanälen. Im Gegensatz dazu, kommt es durch niedrige Temperaturen $8-28^\circ\text{C}$ zur Aktivierung von TRPM1-Kanälen [24].

Die genannten Beispiele sollen lediglich einen groben Überblick über die Steuerung der Ionenkanäle geben. Unerwähnt blieben zudem die Mechanorezeptoren und lichtgesteuerte Ionenkanäle.

1.6 Oberflächenexpression von Ionenkanälen

Die Zellfunktion wird über ein komplexes Zusammenspiel von extrazellulären und intrazellulären Faktoren reguliert. Unter anderem interagieren Proteine an der Zelloberfläche mit intrazellulären Proteinen/Molekülen und nehmen so maßgeblich Einfluss auf die Zellfunktion. So leuchtet ein, dass Zellen, um überhaupt mit ihrer Umgebung in Interaktion zu treten, entsprechende Proteine an ihrer Oberfläche exprimieren müssen [95]. Neben der Oberflächenexpression von Proteinen sind Zellen jedoch auch in der Lage die Oberflächenexpression der Proteine schnell zu erhöhen oder vermindern und somit die Zellfunktion zu verändern. Diese Funktion wird aufrechterhalten durch spezialisierte *trafficking processes*, die als *constitutive cycling* bezeichnet werden [105, 95].

Dass bereits einige Proteine dem *constitutive cycling* unterliegen ist bekannt. Das prominenteste Beispiel ist vermutlich der epitheliale Na^+ -Kanal (ENaC). Dieser wird von vielen Zellen exprimiert. Von herausragender Bedeutung ist er vor allem für die erneute Absorption von Na^+ in den distalen Tubuli des Nephrons. In den Tubuluszellen wird der ENaC vor allem apikal exprimiert. Über ihn strömt konzentrationsabhängig Na^+ aus dem Tubulus in die Tubuluszelle. Seine Regulation ist komplex. Einerseits kann die Offenwahrscheinlichkeit und Oberflächenexpression über die intrazelluläre Na^+ -Konzentration reguliert werden. Denn bei Konzentrationszunahme kommt es zu einer Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit und Abnahme der Oberflächenexpression Frindt et al., 1993,. Die wichtigste Rolle spielt vermutlich das Hormon Aldosteron. Dieses führt zu einer vermehrten Synthese der α -Untereinheit des ENaC. Dies geht einher mit einer Umverteilung des ENaC von intrazellulär an die Zelloberfläche [61, 39, 40]. Das genannte Beispiel soll lediglich der Veranschaulichung dienen und zu einem Überblick verhelfen. Neben dem genannten Ionenkanal werden auch andere Proteine bspw. GLUT4, Aquaporine, GABA_A -Rezeptor etc. über *constitutive cycling* reguliert [105, 123, 124, 95, 127]. Auch einige TRP-Kanäle scheinen über das *constitutive cycling* reguliert werden [37]. Da auf dem TRPV2-Kanal der Fokus dieser Arbeit liegt, werden im nächsten Abschnitt die TRP-Kanäle vorgestellt.

1.7 TRP-Kanäle

Übersicht

Die Familie der TRP-Kanäle umfasst eine Gruppe an Ionenkanälen, die in nahezu allen humanen Zellen exprimiert werden und Vielzahl an unterschiedlichsten physiologischen Funktionen erfüllen [95]. Gemeinsamkeiten haben die TRP-Kanäle u.a. aufgrund ihres Aufbaus (6 transmembranale Domänen) und ihrer Aminosäuresequenz (s. 1.4). Die Mehrheit der TRP-Kanäle sind nicht-selektive Kationenkanäle. Dabei kann die Selektivität für das jeweilige Kation (insbesondere Na^+ und Ca^{2+}) stark variieren [26, 90].

Die Entdeckung der TRP-Kanäle gelang durch Untersuchungen an Photorezeptoren der *Drosophila melanogaster*. Man untersuchte diese mittels eines Elektoretinogramms. Wildtyp *D. melanogaster* reagierten auf Lichtexposition mit einer kurzzeitigen (*transient*) elektrischen Potentialsteigerung. Derartige Potentialsteigerungen blieben in *D. melanogaster* mit Mutationen im TRP-Gen aus. Stattdessen ist ein konstant niedriges Potential messbar gewesen. Dieses wurde später darauf zurückgeführt, dass die Mutation im TRP-Gen einen Defekt in einem TRP-Kanal verursacht hat, der durch einen kurzzeitigen Ca^{2+} -Einstrom für die Potentialsteigerung verantwortlich gewesen ist [32, 26]. Ein weiterer Durchbruch gelang 1989, als das TRP-Gen anhand von *D. melanogaster* von Montell and Rubin [82] entschlüsselt und als Protein beschrieben werden konnte. Später sind weitere Versuche an Schmeißfliegen (*Calliphora erythrocephala*) von Hochstrate [50] durchgeführt worden. Sie untersuchten deren Photorezeptoren und setzten diese Lichtimpulsen aus. Zudem inkubierten sie die Zellen mit Lanthan, welches ein Ca^{2+} -Kanal Blocker ist. Erstaunlicherweise kamen sie zu ähnlichen Messergebnissen, wie Cosens and Manning [32]: Durch die Inkubation mit Lanthan konnte eine kurzzeitige Potentialsteigerung unterdrückt werden, ähnlich wie in den TRP-Gen mutierten *D. melanogaster*. Später untersuchten auch Suss-Toby et al. [121] die Photorezeptoren diverser Fliegen in ähnlicher Art und Weise wie zuvor Hochstrate et al. Auch sie konnten über die Applikation von Lanthan eine Depolarisation der Photorezeptoren unterdrücken. Unter der Annahme, dass intrazelluläres Ca^{2+} für eine Potentialsteigerung der Zelle nach Lichtexposition notwendig ist, folgerte man, dass TRP-Proteine die Konzentration an intrazellulärem Ca^{2+} schnell erhöhen können. Daher mussten TRP-Proteine Ca^{2+} -Kanäle sein [80]. Die Gesamtheit der TRP-Kanäle umfasst heute 28 Mitglieder, die in 6 Familien aufgeteilt sind.

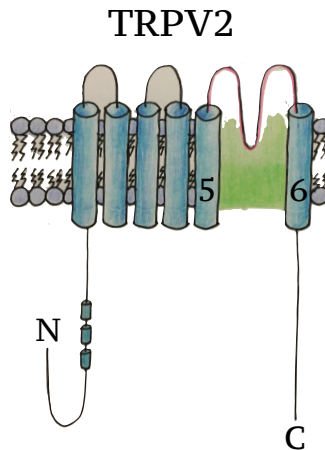


Abbildung 1.4: Schemazeichnung der TRPV-Kanäle. Die *pore forming domain* liegt zwischen den Domänen S5 und S6. Im Bereich des N-Terminus bestehen mehrere Ankyrin Wiederholungen. Angelehnt an [112].

TRPV2

Der erste Kanal, der der TRPV-Familie (*transient receptor potential vanilloid*) hinzuge-rechnet wurde, ist der OSM-9 Kanal gewesen. Diesen entdeckten Colbert and Bargmann [28] im Jahr 1995, indem sie Versuche an *C. elegans* durchführten. Sie setzten diese verschiedenen Geruchsstoffen aus und untersuchten mit Hilfe eines Chemotaxis Assays, ob eine Adaptation an die Geruchsstoffe stattfindet. Neben wildtyp *C. elegans* untersuchten sie u.a. OSM-9 mutierte. Beide adaptierten sich an die Geruchsstoffe, jedoch ist das Spektrum der Geruchsstoffe unterschiedlich gewesen. Später konnten sie das Protein OSM-9 nachweisen und stellten zudem eine große Ähnlichkeit mit den in *Drosophila* beschriebenen [82] TRP-Kanälen fest [29].

Kurze Zeit später wurde ein weiterer Kanal, der der TRPV-Familie hinzuzurechnen ist, entdeckt. Der Nachweis des sog. TRPV1-Kanals gelang Caterina et al. [20], indem sie eine cDNA Bank aus der mRNA von Neuronen aus Hinterwurzelganglien erstellten. Diese wurden in HEK293 Zellen transfiziert. Die transfizierten HEK293 Zellen wurden entweder mit Capsaicin oder Resiniferatoxin inkubiert und mit Hilfe von Ca^{2+} Imaging (Fura-2) untersucht. Letztlich konnte ein Klon herausgefiltert werden, der auf die Inkubation sowohl mit Capsaicin, als auch Resiniferatoxin mit einem starken intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg reagierte. Durch weitere Versuche konnten Caterina et al. zeigen, dass die transfizierte cDNA für ein Ca^{2+} leitenden Kationenkanal codierte, der auch durch Temperaturanstiege aktiviert werden konnte. Der Kanal wurde zunächst vanilloid receptor subtype 1 (VR1) genannt, da er durch Capsaicin und Resiniferatoxin aktiviert werden konnte. Capsaicin ist ein Alkaloid, das aus Chilischoten gewon-

nen werden und den Sinneseindruck der Schärfe vermitteln kann. Resiniferatoxin ist ein Analog des Capsaicins und teilt mit ihm die Vanillinmandelsäure als gemeinsame chemische Grundstruktur. Daher wurde der entdeckte Capsaicin-Rezeptor Vanilloid-Rezeptor genannt [122, 20].

Zwei Jahre später gelang ebenfalls Caterina et al. [21] der Nachweis des nächsten TRPV-Kanals, nämlich TRPV2. Dies gelang ihnen durch eine Gendatenbank Analyse. Dort suchten sie nach Sequenzen, die Ähnlichkeit zu VR1 besaßen. Eine von ihnen entdeckte Sequenz codierte für ein Protein, das eine große strukturelle Ähnlichkeit zu OSM-9 und VR1 besaß. Denn es besaß ebenso 6 Transmembrandomänen, einen N-Terminus mit drei Ankyrin-Motiven und einen zytoplasmatischen C-Terminus. Aufgrund der Ähnlichkeiten nannten sie es VRL-1 (*vanilloid-receptor-like-protein 1*), später auch TRPV2-Kanal genannt. Durch Versuche an TRPV2 transfizierten *Xenopus oocytes* und HEK293 Zellen versuchten sie, das Protein zu charakterisieren. Die hierbei gewonnen Erkenntnisse zeigten, dass TRPV2 ebenfalls ein Ca^{2+} leitender Kationenkanal ist. Die Permeabilität für Kationen ähnelte der des VR1-Kanals: $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+ \approx \text{Cs}^+ \approx \text{K}^+$. Zudem konnte die Offenwahrscheinlichkeit des TRPV2-Kanals auch durch Temperatursteigerungen erhöht werden. Allerdings lag die Temperaturschwelle in TRPV2 transfizierten *Xenopus oocytes* oder HEK293 Zellen bei $>50^\circ\text{C}$. Dieser lag demnach deutlich über der Aktivierungsschwelle für VR1 ($> 43^\circ\text{C}$) [20]. Erstaunlicherweise führte eine Inkubation mit Capsaicin respektive Resiniferatoxin zu keiner Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit.

Später konnte der TRPV2-Kanal in vielen verschiedenen Zellen nachgewiesen werden [53, 21, 84], sowie unter anderem auch in retinalen Pigmentepithelzellen [31].

Struktur:

Eine Gemeinsamkeit der TRP Kanäle sind die 6 Transmembrandomänen. Aufgrund der ähnlichen Struktur zu den K^+ -Kanälen geht man davon aus, dass die transmembranal Domänen in Tetrameren organisiert sind [134]. Die Pore (*P-Loop*) befindet sich zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne. Sowohl der N-, als auch C-Terminus liegt im Cytosol. Sie sind wichtig für die Regulation des Kanals, sowie die Interaktion mit anderen Molekülen/Proteinen. Beispielsweise besitzen TRPV2-Kanäle drei Ankyrin-Wiederholungen an ihrem N-Terminus, über deren Phosphorylierung Einfluss auf den Kanal genommen werden kann [57, 94]. Sowohl für den TRPV1- als auch TRPV2-Kanal konnte gezeigt werden, dass sie sich in Heteromultimeren organisieren und dadurch gegenseitig beeinflussen können [133, 47, 72].

Eigenschaften:

- Permeabilität

Die Permeabilität des TRPV2-Kanals ist für Ca^{2+} höher als für Na^+ ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}=3/1$).

Die Permeabilität für Kationen nimmt in dieser Reihenfolge ab: $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+ \approx \text{K}^+ \approx \text{Cs}$ [21].

- elektrophysiologische Charakteristika

In Kochsalzlösung liegt das Umkehrpotential des TRPV2-Kanals bei $\approx 0\text{mV}$.

Die Strom-Spannungs-Linie verläuft auswärts-rektifizierend [26].

- Inhibitoren

Bekannte Inhibitoren des TRPV2-Kanals sind u.a. Ruthenium Rot (RR), Lanthan (La^{3+}), SKF96365, TRIM (1-[2-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-imidazol), Amilorid [26, 58, 71].

- Aktivatoren

Bekannte Aktivatoren des TRPV2-Kanals sind unter anderem 2-APB (*Aminoethoxydiphenylborat*) und Probenecid [52, 58, 3, 97]. Weitere Aktivatoren werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

Steuerung (*Gating*) / Oberflächenexpression:

Die Steuerung der TRP-Kanäle ist komplex. Grund dafür sind die vielen Wege, auf denen sie aktiviert werden können. So können sie nicht nur durch das Binden eines Liganden oder Spannungsunterschiede aktiviert werden, sondern auch durch pH-Wert- oder Osmolaritäts-Verschiebungen, Schmerz und physikalische Reize (Wärme, Licht, Dehnung) etc. Außerdem bestehen zwischen den Proteinen einzelner Unterfamilien (bspw. TRPV, TRPM, etc.) starke Unterschiede in der Aktivierung [24]. So muss jeder Kanal beschrieben werden, da nicht von Kongruenz ausgegangen werden kann.

- Temperatur

In ihrer Publikation von 1999 beschrieben Caterina et al. die Aktivierung des TRPV2-Kanals durch Temperaturerhöhungen (s.o.) [21]. Dabei stellte sich heraus, dass die Offenwahrscheinlichkeit von TRPV2-Kanälen erst bei Temperaturen von $> 50^\circ\text{C}$ erhöht wird. Durch repetitive Hitzeapplikationen kann die Reizschwelle nicht gesenkt werden. Die Offenwahrscheinlichkeit von TRPV1-Kanälen wird hingegen bereits bei Temperaturen von $> 43^\circ\text{C}$ erhöht.

- Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren spielen eine wichtige Rolle in der Interaktion von Zellen. In Bezug auf TRPV2-Kanäle scheint u.a. der Wachstumsfaktor IGF-1 die Aktivität der Kanäle regulieren zu können. Cordeiro et al. [31] konnten durch Inkubation von ARPE19/hRPE-Zellen mit IGF-1 einen Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} nachweisen. Dieser Anstieg ging einher mit einer vermehrten Sekretion des Wachstumsfaktors VEGF-A. Durch Inkubation der Zellen mit verschiedenen Aktivatoren/Inhibitoren (bspw. Capsaicin, Ruthenium Rot, Lanthan etc.) konnten

sie ein pharmakologisches Profil des Kanals abbilden. Dieses entsprach dem des TRPV2-Kanals. So konnte die VEGF-A Sekretion, ausgelöst durch Inkubation mit IGF-1, auf TRPV2-Kanalaktivität zurückgeführt werden. Jedoch kann mit Hilfe dieser Versuche kein Rückschluss auf den Aktivierungsmechanismus (vermehrte Oberflächenexpression/Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit) gezogen werden. Dieser Frage wurde jedoch in anderen Publikationen z.T. nachgegangen. Kanzaki et al. [59] beschrieben bereits 1999 mit Hilfe von transfizierten CHO-Zellen einen Kanal, der nach Stimulation mit IGF-1 in die Zellmembran transloziert. Eine weitere Versuchsgruppe um Cohen et al. [27] ging ebenfalls dieser Fragestellung nach. Sie untersuchten anhand von CHO-Zellen und monoklonalen Antikörpern die Wirkung von IGF-1 auf die Oberflächenexpression von TRPV2-Kanälen. Nach Inkubation der CHO-Zellen mit IGF-1 konnten sie im *Biotinylation Assay* lediglich eine geringe Zunahme der Oberflächenexpression von TRPV2-Kanälen nachweisen.

Erkennbar ist, dass nach wie vor fraglich ist, auf welche Art IGF-1 die TRPV2-Kanäle reguliert. Die genannten Publikationen stimmen in dieser Frage nicht überein. Hat IGF-1 letztlich nur Auswirkungen auf die Offenwahrscheinlichkeit oder nimmt auch die Oberflächenexpression zu?

- Cannabinoide

Cannabis Sativa L. wird schon seit Jahrhunderten aufgrund ihrer analgetischen und psychotropen Wirkung geschätzt. Cannabinoide sind Derivate dieser Pflanze. Ihnen gemein ist die Diterpene-Grundstruktur. Das bekannteste Cannabinoid ist wohl das THC (Δ^9 -Tetrahydrocannabinol). Daneben existieren weitere, wie bspw. Cannabidiol, Cannabinol etc. Qin et al. [97] untersuchten die Wirkung der einzelnen Cannabinoide auf TRPV2-Kanäle. Dafür inkubierten sie TRPV2 transfizierte HEK293 Zellen mit den verschiedenen Derivaten (THC, Cannabidiol und Cannabinol). Mit Hilfe von Ca^{2+} Imaging maßen sie daraufhin den Anstieg des intrazellulären freien Ca^{2+} . Sie ermittelten sodann die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) für die verwendeten Cannabinoide. Diese war für Cannabidiol am niedrigsten ($\text{EC}_{50} = 3.3\mu\text{M}$). Damit lag nahe, dass Cannabidiol unter den untersuchten Cannabinoiden der stärkste TRPV2-Kanal Aktivator ist. Später untersuchten Barro-Soria et al. [4], ob TRPV2-Kanäle auch RPE-Zellen exprimiert werden. Dafür inkubierten sie u.a. pRPE-Zellen mit Cannabidiol ($15\mu\text{M}$) und analysierten den Anstieg des intrazellulären freien Ca^{2+} . Dieser Anstieg konnte durch vorherige Inkubation mit SKF96365 (spezifischer TRPV2-Kanal Inhibitor im RPE) unterdrückt werden. Daher führten sie den Anstieg des freien intrazellulären Ca^{2+} auf TRPV2-Kanalaktivität zurück.

Auch hier ist gesichert, dass Cannabidiol TRPV2-Kanäle aktivieren kann. Jedoch

bleibt unbeantwortet, ob dies über eine direkte Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit, oder durch eine vermehrte Oberflächenexpression geschieht.

- PI3-Kinasen

PI3-Kinasen sind Schlüsselenzyme der Signaltransduktion. Über sie werden verschiedene zelluläre Funktionen (Proliferation etc.) reguliert [125]. TRPV2-Kanäle scheinen auch PI3-Kinase abhängig reguliert zu werden. In retinalen Pigmentepithelzellen konnten dies Cordeiro et al. [31] zeigen. Nach Inkubation von ARPE19-Zellen mit IGF-1 (50 ng/mL) wurde das freie zytosolische Ca^{2+} durch Ca^{2+} -Imaging gemessen. Nach wenigen Minuten kam es bereits zu einem deutlichen Anstieg des freien zytosolischen Ca^{2+} . Sodann inkubierten sie die Zellen zunächst mit LY294002 (30 μM) und daraufhin mit IGF-1 (50 ng/mL). LY294002 ist ein bekannter Inhibitor der PI3-Kinase. In den Versuchen führte LY294002 zu einem signifikant geringeren Anstieg des intrazellulären freien Ca^{2+} . Dies bestätigte, dass auch in retinalen Pigmentepithelzellen TRPV2-Kanäle über einen PI3-Kinase Signalweg reguliert werden. Zwar scheint demnach die Regulation von TRPV2-Kanälen einem PI3-Kinase Signalweg zu unterliegen, interessant ist jedoch, ob beide Mechanismen (Oberflächenexpression und direkte Aktivierung) diesem unterliegen.

1.8 Zielsetzung

Die Kenntnis physiologischer Zellvorgänge und pathologischer Veränderungen ist wichtig, um bestehende Therapien zu verbessern, oder auch um neue Therapiemethoden zu entwickeln. TRPV2-Kanäle scheinen bei einer Reihe von Erkrankungen von Bedeutung zu sein. So etwa im Bereich der Ophthalmologie, insbesondere in der Entstehung der altersbedingten Makuladegeneration. Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die Regulation des TRPV2-Kanals im RPE zu untersuchen. Die Mechanismen der vermehrten Oberflächenexpression und die direkte Aktivierung des TRPV2-Kanals sollen dabei differenziert betrachtet werden. Denn fraglich ist, ob verschiedene Aktivatoren über unterschiedliche Mechanismen (vermehrte Oberflächenexpression oder direkte Aktivierung) auf TRPV2-Kanäle wirken. Zudem scheint der PI3-Kinase Signalweg Einfluss auf die Aktivität von TRPV2-Kanälen zu haben. Daher ist es interessant, die beiden Aktivierungsmechanismen hinsichtlich einer möglichen Regulation durch PI3-Kinasen zu untersuchen (s. Abbildung 1.5).

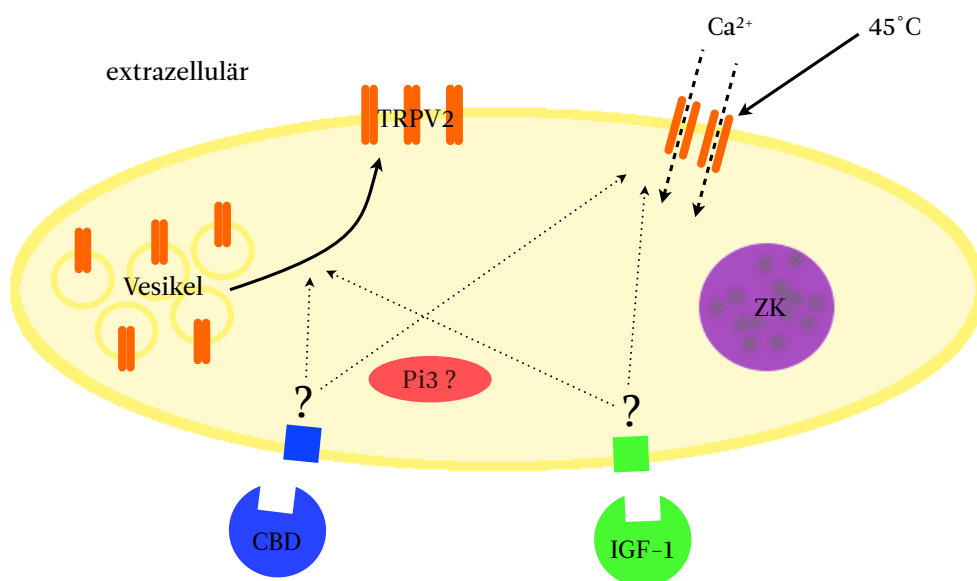


Abbildung 1.5: Schematische Abbildung der zuvor beschriebenen Fragestellung. Ziel ist es die beiden Aktivierungsmechanismen (vermehrte Oberflächenexpression und direkte Aktivierung) in Bezug auf TRPV2-Kanäle zu untersuchen. Dabei scheint zudem der Einfluss des PI3-Kinase Signalwegs eine Rolle zu spielen.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Für die Experimente wurden Zellen der humanen Zelllinie (ARPE19-Zellen (ATCC cat # CRL-3202) verwendet. Das Medium setzte sich aus DMEM/F12 (*Life Technologies Darmstadt, Deutschland*), 10% fetalem Kalbserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin zusammen. Die Temperatur im Inkubator betrug 37°C und besaß einen 5%igen CO₂ Gehalt.

Für die Patch-Clamp Experimente wurden die Zellen passagiert und auf Cover-Slips dünn ausgesät. Dies erleichterte das Patchen einzelner Zellen. Nach 12-48h in serum-freiem Medium (37°C) wurden die Zellen elektrophysiologisch untersucht.

Passagieren

Eine 24-Well-Platte wurde vorbereitet. In jedes Well wurde ein Coverslip (12mm Durchmesser) gelegt.

Das Medium in den Brutflaschen wurde mit Hilfe einer Vakuum-Pumpe abgesaugt. Daraufhin wurden 2ml Trypsin/EDTA Lösung (37°C) in die Brutflaschen pipetiert.

Trypsin ist eine Endopeptidase und spaltet selektiv Peptidbindungen nach basischen Aminosäuren (*Lysin und Arginin*). Die Einwirkungszeit des Trypsins auf den Zellverband sollte nur 2-3 Minuten erfolgen, da sonst auch intrazelluläre Peptidverbindungen gespalten werden. Dies hätte eine Nekrose der Zellen zur Folge. EDTA ist ein sechszähliger Komplexlignand und bindet vor allem zweifachpositiv geladene Ionen, wie z.B. Mg²⁺. Da Mg²⁺ zu einer erhöhten Stabilität der Zellverbandes führt, erleichtert EDTA das Lösen des Zellverbandes.

Die Flasche wurde für 3-5min im Inkubator belassen. Danach wurde unter Sichtkontrolle unter dem Mikroskop geprüft, ob sich der Zellrasen gelöst hat. Durch leichtes Schütteln der Flasche konnte dies erleichtert werden.

Um das Trypsin wieder auszuwaschen, wurden 8ml 1xPBS in die Flasche pipettiert.

Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wurde die Zellsuspension in einem Falcontube (15ml) zentrifugiert (3min bei 3000 Umdrehungen/min).

Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das gewonnene Pellet wurde in 12ml 0% Medium resuspendiert.

Nun wurden in jedes Well der Multiwell-Platte 250µl der Zellsuspension pipettiert und auf 2ml mit serumfreiem Medium aufgefüllt. Der Rest der Zellsuspension wurde erneut bei 3000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 4ml 10% Medium suspendiert. Die Suspension wurde in eine Kulturflasche pipettiert und als weitere Passage gekennzeichnet.

Kulturflasche und Multiwellplatte wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24h konnten die Zellen im Multiwell für die Patch-Clamp Versuche verwendet werden.

2.2 Patch Clamping

Die Patch-Clamp-Technik erlaubt die Messung der Ströme, die durch einzelne oder mehrere Ionenkanäle in der Zellmembran fließen.

Erstmals angewendet und veröffentlicht wurde diese Methode im Jahr 1976 von Bert Sakman und Erwin Neher. [87]

Als Grundlage diente damals die von Kenneth Cole entdeckte Methode des Voltage-Clamps [30]. Diese funktionierte mittels zwei Elektroden. Während die erste Elektrode das Membranpotential mißt, wird über die zweite Elektrode elektrische Ladungen appliziert.

Bei einem Aktionspotential gelingt es dann, durch Injektion von Ladung die Sollspannung der ersten Elektrode aufrecht zu erhalten. Der Kompensationsstrom ist das Äquivalent, des während des Aktionspotentials geflossenen Stromes.

Ein Fortschritt war die von Sakman und Neher entwickelte Methode, durch die es erstmalig möglich war Einzelkanalmessungen durchzuführen:

Hier wird lediglich eine Elektrode verwendet. Diese mißt den Membranstrom über einen hohen Referenzwiderstand und ist mit dem Verstärker verbunden. Fließt ein Strom über die Membran, so würde sich auch die Spannung am Referenzwiderstand ändern. Dies verhindert ein Schaltkreis im Verstärker, die benötigte Kompensationsspannung entspricht dem geflossenen Strom.

Versuchsaufbau

Der Aufbau des Messplatzes entsprach Folgendem:

Das Invertmikroskop (*Zeiss, Jena*) befand sich auf einem schwingungsgedämpften Messtisch, umgeben von einem faradayschem Käfig.

Beides schirmte den Messplatz gegenüber äußeren Störsignalen, Vibrationen oder elektromagnetischen Wellen, ab. Außerhalb des Käfigs befand sich eine Kochplatte, mit deren Hilfe die Perfusionslösung erhitzt werden konnte. Das Perfusionssystem bestand aus einem zuführenden Schlauch, der in die Perfusionskammer führte und einem abführenden Schlauch, über den die verbrauchte Lösung abfließen konnte. Eine Rollerpumpe sorgte für den Durchfluss der Lösung.

Das Invertmikroskop war mit einem beweglichen Objektisch, auf dem sich die Perfusionskammer befand, ausgestattet. Die Patchpipette befand sich mitsamt Operationsverstärker auf der Mikromanipulator-Einheit (*Luigs & Neumann, Düsseldorf*). Über den Mikromanipulator konnte diese Einheit, entlang von drei verschiedenen Achsen präzise bewegt werden.

Sowohl die Patch-, als auch die Referenzelektroden bestanden aus Silberdrähten, die regelmäßig chloriert wurden. Weiterhin war die Patchpitte über ein Schlauchsystem mit einer Wassersäule verbunden. Mithilfe eines Dreiwegehahns konnte man den von

außen applizierten Druck aufrechterhalten.

Das vom Operationsverstärker registrierte Signal wurde über den Patch-Clamp-Verstärker (*EPC-7*, *HEKA*, *Lamprecht/Pfalz*) und das *ITC15*-Board (*HEKA*, *Lamprecht*, *Pfalz*) an den Computer weitergegeben. Dort konnte, mithilfe der entsprechenden Software (*Turbo Pascal Interface for Data Acquisition (TIDA)*, *HEKA*), das Stimulationsprotokoll gestartet und die Ergebnisse analysiert werden.

Versuchsablauf

Die Versuche wurden bei Raumtemperatur (22-25°C) durchgeführt. Dies wirkte sich positiv auf die Stabilität der Zellmembranen aus und erleichterte das Patchen.

Das Experiment erfolgte nach folgenden Schritten:

Zu Beginn wurde die Probe in die bereits geflutete Badkammer platziert. Diese war mit dem Objektisch des Invert-Mikroskopes verbunden, sodass mit Hilfe der Objektisch-Steuerknöpfe eine passende Zelle, unter Sichtkontrolle, ausgewählt werden konnte. Bevor die Pipette mit Hilfe des Mikromanipulators in die Badkammer getaucht wurde, entsprach die Stromantwort Abbildung 2.1 (aus [81]). Es lag noch kein geschlossener Stromkreis vor.

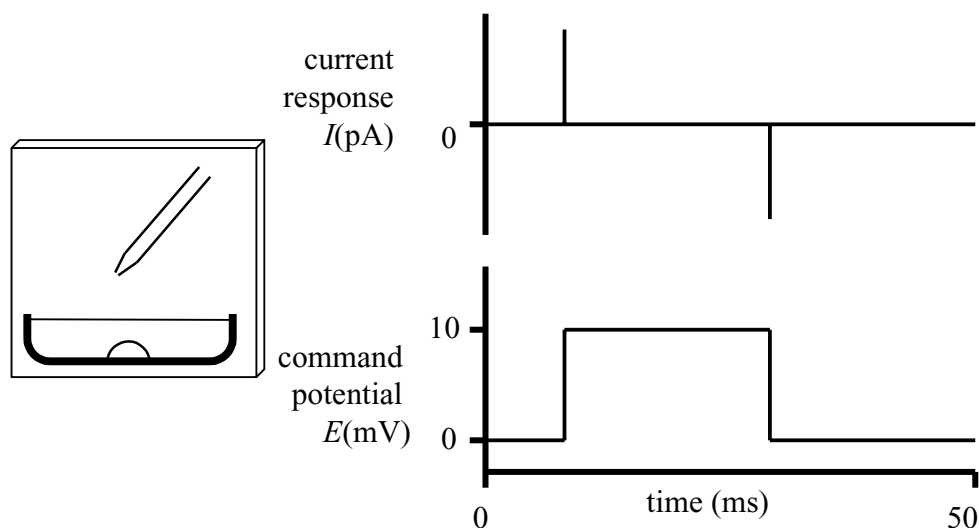


Abbildung 2.1: Prinzip der Stromantwort (*current response*) auf einen Testimpuls von 10mV (*command potential*). Wie in der Abbildung dargestellt, befindet sich die Pipette noch außerhalb der Badlösung, so dass zwischen Pipette und Referenzelektrode noch kein geschlossener Stromkreis vorliegt. Daher erfolgt keine Stromantwort auf den Testimpuls (aus [81]).

Sobald sich die Pipette in der Lösung befand, schloß sich der Stromkreis und auf den Testimpuls von 10mV ergab sich eine Stromantwort entsprechend Abbildung 2.2.

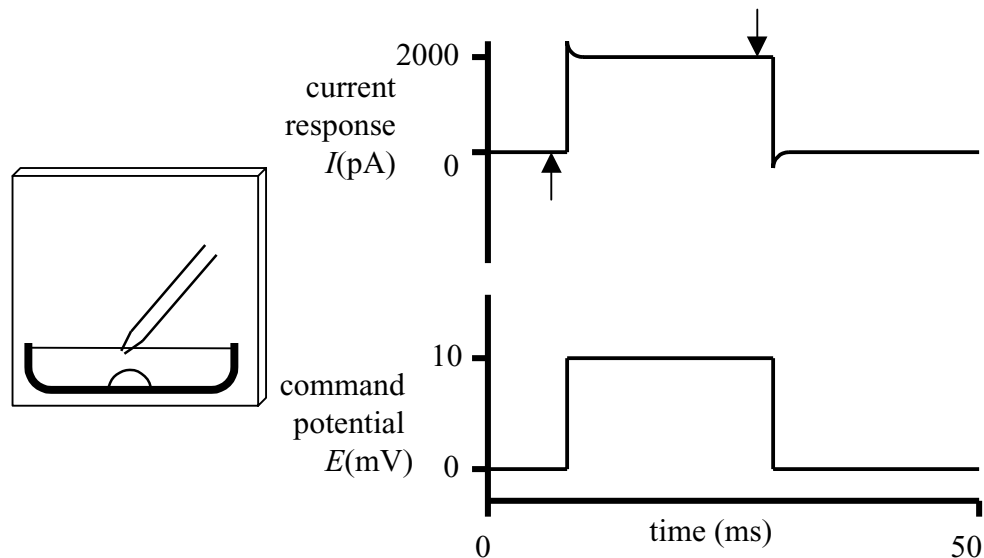


Abbildung 2.2: Prinzip der Stromantwort (*current response*) auf einen Testimpuls von 10mV (*command potential*). Wie in der Abbildung dargestellt, befindet sich die Pipette nun innerhalb der Badlösung, so dass zwischen Pipette und Referenzelektrode ein geschlossener Stromkreis vorliegt. Auf den Testimpuls folgt eine Stromantwort von 2000pA (aus [81])

Als Nächstes wurde über das Schlauchsystem leicht positiver Druck ausgeübt. Dies verhinderte eine Verunreinigung der Pipettenspitze durch die Badlösung. Nun wurde die Pipette vorsichtig in die Nähe der Zelle gebracht, bis diese die Zellmembran berührte. Dies führte schlagartig zu einem Abfall der Stromantwort, durch Anstieg des Widerstandes. Die Stromantwort entsprach daraufhin Abbildung 2.3.

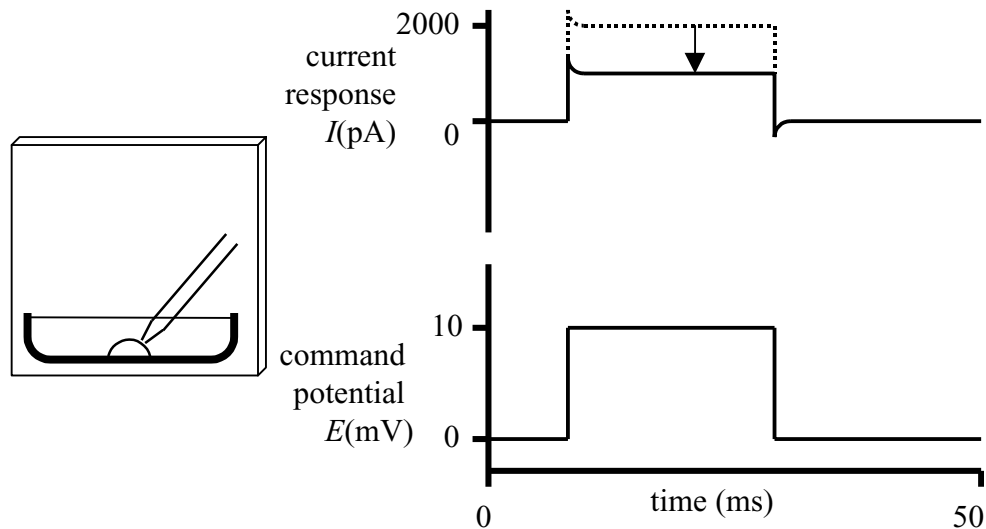


Abbildung 2.3: Prinzip der Stromantwort (*current response*) auf einen Testimpuls von 10mV (*command potential*). Wie in der Abbildung dargestellt, berührt die Pipette bereits die Zellmembran. Es kommt zum Absinken der Stromantwort, da sich der Widerstand erhöht (aus [81]).

Als nächstes wurde über das Schlauchsystem ein Unterdruck erzeugt. Dadurch verband sich die Zellmembran fest mit der Pipettenspitze und der Widerstand stieg in den Gigaohm Bereich an, der Strom reduzierte sich auf $< 10\text{pA}$. Die entstandene Verbindung wird deswegen auch Gigaseal genannt (s. Abbildung 2.4). Durch eine stabilen Gigaseal wird das Auftreten von Leckströmen minimiert, wodurch die Messung an Genauigkeit gewinnt.

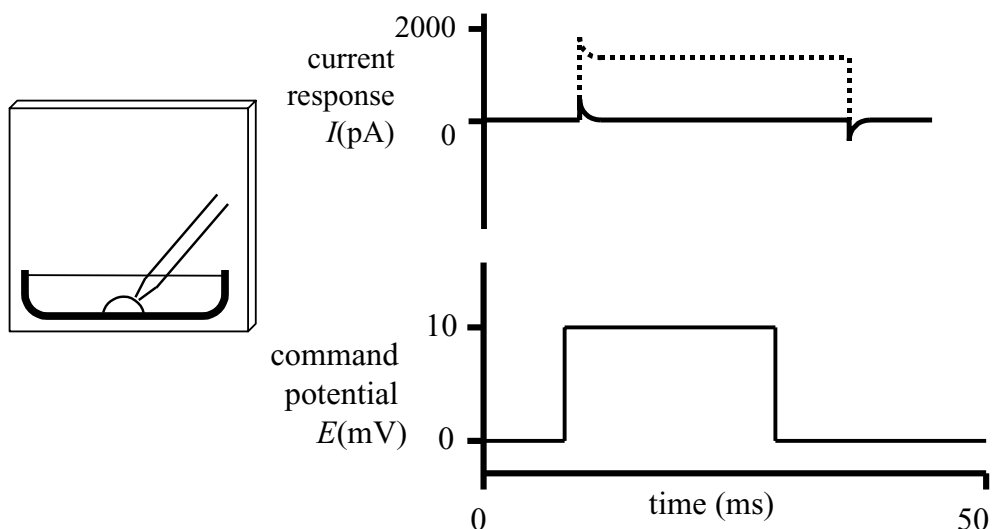


Abbildung 2.4: Prinzip der Stromantwort (*current response*) auf einen Testimpuls von 10mV (*command potential*). Wie in der Abbildung dargestellt, hat sich die Pipette durch den Unterdruck fest mit der Zellmembran verbunden. Der Widerstand steigt in den Gigaohm bereich an und lässt nur einen geringen Strom zu (aus [81]).

Die vorliegende Konfiguration wird auch als „Cell-attached Mode“ bezeichnet und bildet den Ausgangspunkt für alle weiteren Konfigurationen, die nun erreicht werden können: Whole-Cell (s. Abbildung 2.5), Inside-Out und Outside-Out.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich in Whole-Cell Konfiguration gearbeitet. Um diese zu erreichen wurde im Cell-attached Mode etwas Unterdruck über die Pipette auf die Zellmembran ausgeübt. Ab einem bestimmten Druck riss die Zellmembran unter der Pipettenspitze auf. Dadurch bestand eine direkte Verbindung zwischen Pipette und Intrazellulärraum. Die Stromantwort entsprach dann Abbildung 2.5. Dies bestätigte, dass ein Whole Cell Modus vorlag.

Vorteile des Whole Cell Modus waren, dass so der gesamte Strom, der über die Zellmembran floss, gemessen werden konnte. Schnell konnte beurteilt werden, welche Ionenkanäle an der Stromantwort beteiligt sind. Gleichzeitig konnte die Zusammensetzung des Cytosols kontrolliert werden und mittels diverser Substanzen auf extrazellulärer Seite stimuliert/inhibiert werden. Nachteilig war dabei die direkte Verbindung des Cytosols mit der Pipettenlösung, da einige intrazelluläre Faktoren so ausgewaschen wurden. [81]

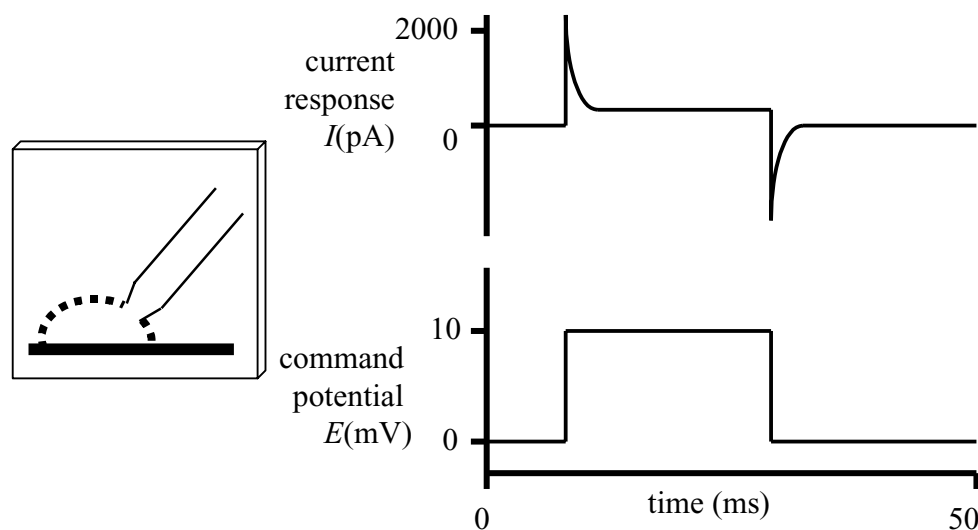


Abbildung 2.5: Prinzip der Stromantwort (*current response*) auf einen Testimpuls von 10mV (*command potential*). Wie in der Abbildung dargestellt, wurde durch etwas Unterdruck an der Pipettenspitze der Whole-Cell Modus erreicht. Dabei entstand die abgebildete charakteristische Stromantwort. Zu Beginn und am Ende entstanden zwei Artefakte, die durch die Pipetten- und Membrankapazität zu erklären sind und durch den Patch-Clamp Versträker kompensiert werden (aus [81]).

Praktische Durchführung

Zunächst wurde die frisch angesetzte Badlösung auf der Kochplatte auf 68,0°C erhitzt. Die Temperatur wurde während des gesamten Vorganges konstant gehalten und mittels Thermometer kontrolliert. Die Aufrechterhaltung dieser hohen Temperatur ist notwendig gewesen, da beim Durchfluss der Lösung durch den zuführenden Schlauch in die Badkammer ein Wärmeverlust entstand. In der Perfusionskammer hatte die Lösung dann die Soll-Temperatur von 45,0°C.

Die für die Versuche verwendeten Glaspipetten wurden am jeweiligen Versuchstag hergestellt. Hierzu wurde ein Mikropipettenzieher verwendet (*DMZ Universal Micro-electrode Puller, Zeitz, Augsburg*), der aus Borosilikatglasröhrchen (*Clark, Maisfeld*) die Pipetten vollautomatisch herstellte. Die Glaspipette wurde sodann mit intrazellulärer Lösung gefüllt, ohne dass Luftblasen in der Flüssigkeit verblieben. Daraufhin wurde die Glaspipette über die Patchelektrode gezogen.

Nun wurde ein Deckgläschen, auf dem sich die am Tag zuvor passagierten Zellen befanden, in die Perfusionskammer gelegt. Durch das Passagieren wurde die Extrazellulärmatrix der ARPE19-Zellen zum größten Teil aufgelöst. Da die Zellen in serumfreien Medium gehalten wurden, war auch die Menge an Extrazellulärmatrix, welche die Zellen über Nacht bildeten, gering. Dies erleichterte das Entstehen eines Gigaseals, da die Extrazellulärmatrix ein direktes Aufliegen der Pipettenspitze auf die Zellmembran erschwerte. Durch das Halten im serumfreiem Medium wurden zusätzlich Einflüsse auf die elektrophysiologische Aktivität der Zelle minimiert.

Nachdem das Deckglas mit den Zellen in die Perfusionskammer gelegt wurde, war eine für den Versuch geeignete Zelle auszuwählen. Geeignet waren vor allem die Zellen, die eine „Spiegelei“-förmige Morphologie aufwiesen. Dies bedeutete: Kern-Plasma Relation zu Gunsten des Plasmas verschoben, der Zellkern lag idealerweise zentral in der Zelle, das Zytoplasma war von Pigment durchzogen.

Als Nächstes wurde die Patchpipette in die Perfusionskammer getaucht. Der Pipettenwiderstand betrug dabei zwischen 3-5 MΩ. Danach kompensierte man das Offsetpotential am Verstärker. Über das Schlauchsystem wurde leicht positiver Druck appliziert, um die Pipettenspitze vor Verunreinigungen zu schützen. Vorsichtig wurde die Pipette der ausgewählten Zelle genähert. Die Entstehung eines Gigaseals wurde insbesondere dann erreicht, wenn man sich der Zelle diagonal und leicht über dem Zellkern versetzt annäherte (s. Abbildung 2.6). Dies hatte den Vorteil, dass die durch den Mikromanipulator vorgegebene Bewegungsrichtung entlang der longitudinalen Achse der Pipette selbst verlief. Zudem war an der entsprechenden Fläche die Zellmembran gegenüber der Pipettenspitze flach exponiert. Hierdurch wurde ein Kontakt der kompletten Pipettenspitze mit der Zellmembran ermöglicht.

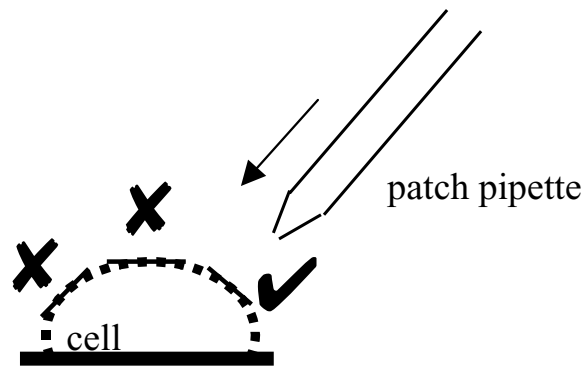


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der korrekten Annäherungsweise der Pipette an eine Zelle (aus [81])

Sobald die Pipettenspitze die Zellmembran berührte, kam es zu einem deutlichen Abfall der Stromantwort auf den Testimpuls. Daraufhin konnte durch Saugen am Schlauchsystem negativer Druck ausgeübt werden, wodurch sich die Zellmembran dicht mit der Pipettenspitze verband. Ein Gigaseal entstand, sobald der Widerstand auf mindestens $1\text{G}\Omega$ angestiegen war, beziehungsweise der Testimpuls von 10mV eine Stromantwort von max. 10pA generierte.

Sodann wurde das Potential der Zelle über den Patch-Clamp-Verstärker auf -40mV geklemmt. Dies entsprach dem Ruhepotential der Zellen und stabilisierte die Verbindung zwischen Pipette und Zellmembran.

Da alle Experimente im Whole-Cell-Modus stattfanden, wurde der negative Druck an der Pipettenspitze solange verstärkt, bis sich die Stromantwort durch Zellkapazität, Zugangswiderstand und Pipettenwiderstand charakteristisch veränderte (s. Abbildung 2.5). Als nächstes wurde mithilfe des Integrals unter der Stromkurve (*unter Ausschluss der kapazitiven Effekte*) die Membrankapazität der Zelle berechnet. Schließlich wurden noch die kapazitiven Effekte über einen Regler am Patch-Clamp-Verstärker ausgeglichen, sodass mit der Messung begonnen werden konnte.

Stimulationsprotokolle

Für die Versuche wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet. Das erste Protokoll (*Rampenprotokoll*) erlaubte eine kontinuierliche Aufnahme über 160 Sekunden. Eine einzelne Stimulation dauerte 0,5 Sekunden und zwischen den Stimulationen lag ein Zeitfenster von 1,1 Sekunden. Ausgehend von einem Haltepotential (-40mV), welches dem Ruhepotential der Zellen entsprach, stieg bei Stimulation das Potential von -140mV bis +60mV linear an. Der Anstieg verlief über einen Bereich von 200mV (s. Abbildung 2.7).

Das Protokoll bot folgende Vorteile:

Wegen des vergleichsweise langen Zeitfensters von 160 Sekunden konnte eine ausgedehnte Aufzeichnung über den Strom, der durch die Membran floss, gewonnen werden. Durch die hohe Frequenz, mit der die Stimulationen aufeinander folgten, konnten Veränderungen zeitnah erfasst und abgebildet werden.

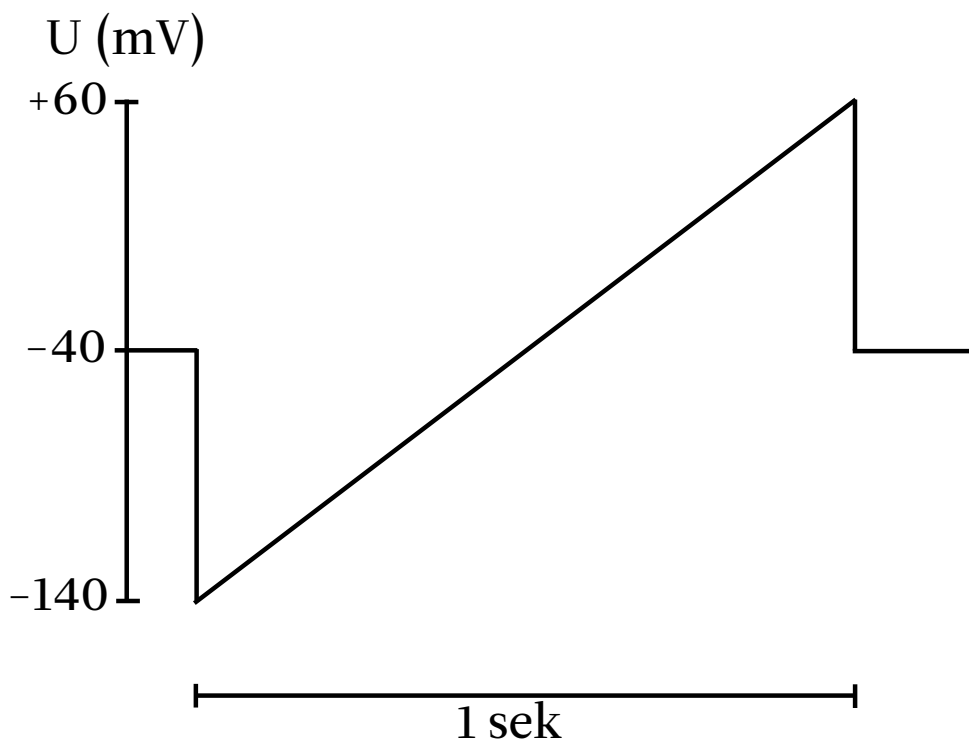


Abbildung 2.7: Schematische Abbildung des *Rampenprotokolls*. Die Werte sind Spannungsangaben und entsprechen den Anfangs- bzw. Endwerten.

Das zweite Protokoll (*Pawel-Rev*) war ebenfalls eine kontinuierliche Aufnahme über 125 Sekunden. Eine Stimulation dauerte 2 Sekunden, zwischen zwei aufeinanderfolgenden Stimulationen lag ein Fenster von 0,5 Sekunden.

Wieder wurde ein Haltepotential von -40mV gewählt. Sodann wurden die Zellen zehnmal für jeweils 0,1 Sekunden mit aufsteigenden Potentialen stimuliert. Begonnen wurde bei -140mV, die Potentialdifferenz zur jeweils nächsten Stimulation lag bei 20mV, sodass maximal +60mV erreicht wurden. Zwischen den Stimulationen wurde das Potential für 0,1 Sekunden bei -40mV gehalten (s. Abbildung 2.8)

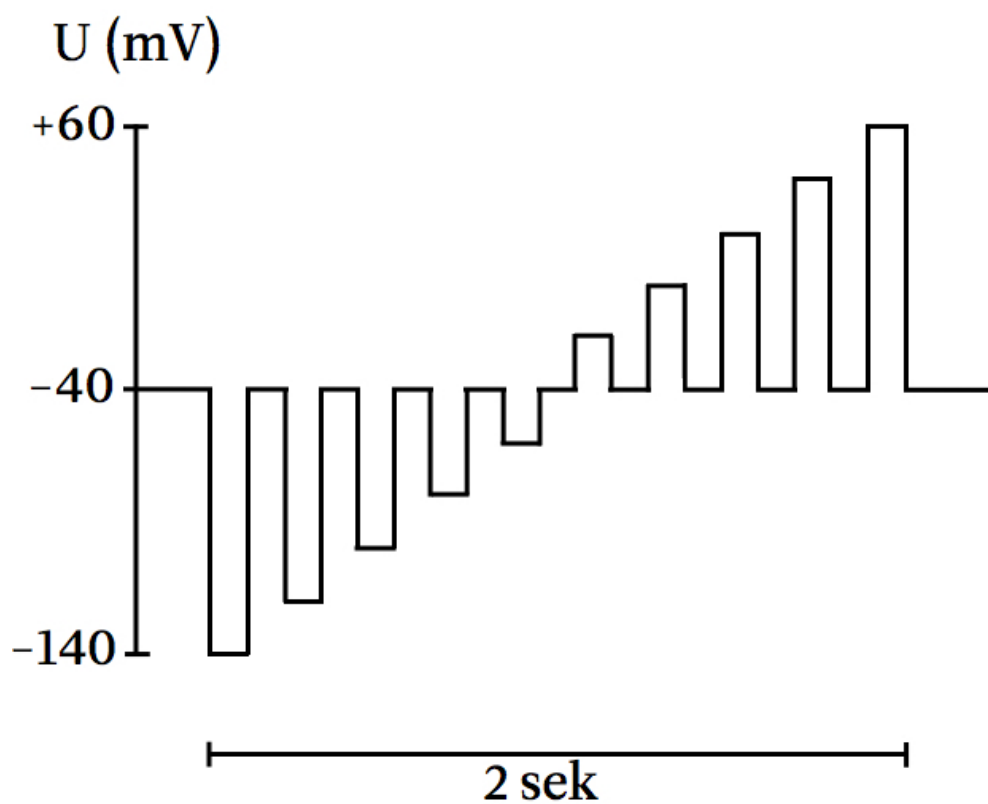


Abbildung 2.8: Schematische Abbildung des *Pawel-Rev*. Die Werte sind Spannungsangaben und entsprechen den Anfangs- bzw. Endwerten.

2.3 Lösungen und Chemikalien

Lösungen und Chemikalien für Patch-Clamp Experimente

Die für die Experimente benötigte Bad- und Pipettenlösung wurde kaliumfrei gehalten. Dies war notwendig, um die Aktivität von Maxi-K-Kanälen zu unterbinden, da sie die Ströme anderer Kanäle deutlich überlagert hätten.

Die Lösungen wurden mit HEPES gepuffert, sowie auf einen pH von 7,4 (*Badlösung*) oder 7,2 (*Pipettenlösung*) mit Natriumhydroxid oder Tris titriert. Vor Gebrauch wurden alle Lösungen einmalig gefiltert. Die Zusammensetzung der Lösungen ist Tabelle 1.1 zu entnehmen.

Substanz	Badlösung (mM)	Pipettenlösung (mM)
NaCl	136	10
CsCl	6,3	100
MgCl ₂	0,9	2
CaCl ₂	1	0,5
NaHCO ₃	4,2	-
Na ₂ HPO ₄	1,1	-
HEPES	25	10
Glukose	1,1	-
EGTA	-	5,5

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Bad- und Pipettenlösung

Weitere Substanzen, die für die pharmakologische Charakterisierung oder zur Stimulation der TRPV2-Kanäle gebraucht wurden, sind:

Substanz	Konzentration (µM)
Cannabidiol (<i>Tocris Bioscience, Wiesbaden</i>)	5
Ruthenium Rot (<i>Sigma Aldrich, München</i>)	20
SKF 96365 (<i>Tocris Bioscience, Wiesbaden</i>)	20
LY 294002 (<i>Sigma Aldrich, München</i>)	30
Lanthan	100
Insulin-like Growth Factor 1	50 (ng/ml)

Tabelle 2.2: Substanzen für die pharmakologische Charakterisierung oder Stimulation der TRPV2 Kanäle

Lösungen und Chemikalien für Zellkultur

- Dulbecco's modified Eagle medium: Nutrient Mixtur F-12 (*DMEM/F-12*, *GIBCO*)
- Zusatz Streptomycin und Penicillin, sowie 10%FCS
- Trypsinlösung
- phosphatgepufferte Salzlösung (*PBS*)

Kapitel 3

Ergebnisse

Im vorangegangenen Kapitel wurde der Versuchsablauf im Einzelnen dargestellt. Alle Aufnahmen erfolgten im Whole-Cell Modus. Zwei verschiedene Stimulationsprotokolle wurden angewandt.

Da in den Versuchen ARPE19-Zellen mittels erhitzter Extrazellulärlösung stimuliert wurden, ist auf eine Besonderheit hinzuweisen:

Die Temperaturerhöhung der Badlösung führte oft zur Instabilität des Patches, bzw. Membran und so zu Fluktuationen in der Messung. Deshalb wurden ausschließlich Aufnahmen ausgewertet, die über den Zeitraum von mindestens 40 Sekunden nach Hitzeimpuls stabil waren und keine Fluktuationen zeigten.

Nach Hitzeimpuls wurden die Ströme für die Auswertung herangezogen, die 25 Sekunden nach Hitzeimpuls gemessen wurden. Als Ruhewert galten Ströme, die circa 10 Sekunden vor Hitzeimpuls gemessen wurden.

Die Membrankapazität der Zellen wurde vor der Applikation der jeweiligen Substanzen, bzw. vor Hitzeimpuls gemessen.

Gesamtströme, sowie Ein- und Auswärtsströme wurden vor und nach Applikation/Hitzeimpuls gemessen, ebenso die Umkehrpotentiale.

Um zu verhindern, dass die gesuchten TRPV2 Ströme von Maxi-K⁺-Kanalaktivität überlagert wurden, wurde eine kaliumfreie Extra- und Intrazellulärlösung verwendet. Für die Analyse wurde nicht die absolute Leitfähigkeit (pA) der Zellen herangezogen, sondern stets die Stromdichte ($pApF^{-1}$). Dadurch konnte man die Zellen untereinander besser vergleichen, da so die Zellgröße bzw. Membrankapazität, die sich auf die Leitfähigkeit auswirkt, Berücksichtigung fand.

3.1 Kontrollexperimente

Ziel

Um den Einfluss von Lösungsmitteln auf die Ionenströme auszuschließen, wurden Kontrollversuche mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (*DMSO*) durchgeführt.

Ablauf

ARPE19-Zellen wurden 100 Sekunden lang mit DMSO inkubiert. Währenddessen wurde der Membranstrom gemessen. Die Konzentration des Lösungsmittels betrug dabei 1.25 *vol%*.

Ergebnis

In den Versuchen zeigten sich 100 Sekunden nach Substanzapplikation keine signifikanten Veränderungen des Membranstromes: $5.6 \text{ pApF}^{-1} \pm 1.1$ (n=8) vs. $5.7 \text{ pApF}^{-1} \pm 1.2$ (n=8). Gleiches galt für die Ein- und Auswärtsstromdichte. Ebenso zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Umkehr- und Haltepotentiale

Zusammenfassung

DMSO zeigte keinerlei Auswirkung auf die Leitfähigkeit der ARPE19-Zellen. In Abbildung 3.1 ist ein Stimulationsprotokoll aus der Versuchsreihe abgebildet. Tabelle 3.1 stellt eine Übersicht der Ergebnisse aus dieser Versuchsreihe dar.

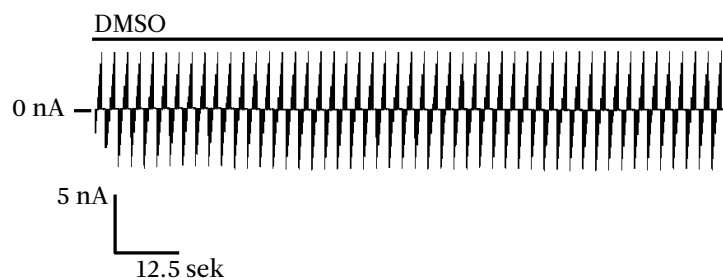


Abbildung 3.1: Untersuchung der Wirkung des Lösungsmittels DMSO (1.25 *vol%*) auf ARPE19-Zellen unter Verwendung des Stimulationsprotokolls *Pawel-Rev*. Es zeigten sich keinerlei Veränderungen der Membranströme und Haltepotentiale.

Verwendete Substrate	DMSO
Anzahl untersuchter Zellen	8
J_{gesamt} Kontrolle (pApF ⁻¹)	5.6 ± 1.14
J_{gesamt} Stimulation (pApF ⁻¹)	5.7 ± 1.2
Steigerung (%)	-1.3 ± 1.5
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	0.07 ± 0.06
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.5 (n.s.)
$J_{einwärts}$ Kontrolle (pApF ⁻¹)	4.4 ± 0.9
$J_{einwärts}$ Stimulation (pApF ⁻¹)	4.5 ± 0.9
Steigerung (%)	2.3 ± 1.7
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	0.1 ± 0.01
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.1 (n.s.)
$J_{auswärts}$ Kontrolle (pApF ⁻¹)	1.1 ± 0.2
$J_{auswärts}$ Stimulation (pApF ⁻¹)	1.0 ± 0.1
Steigerung (%)	-3.8 ± 3.5
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	0.09 ± 0.03
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.1 (n.s.)
J_{hold} Kontrolle (mV)	-50.8 ± 7.4
J_{hold} Stimulation (mV)	-51.5 ± 7.1
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (mV)	0.06 ± 0.2
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.6 (n.s.)

Tabelle 3.1: Überblick über Experimente in denen die Wirkung von DMSO auf ARPE19-Zellen untersucht wurde. Verwendete Abkürzungen: J_{gesamt} = Gesamtstromdichte; $J_{einwärts}$ = Einwärtsstromdichte; $J_{auswärts}$ = Auswärtsstromdichte; ΔJ = Stromdichtendifferenz; J_{hold} = Haltepotential; "Kontrolle" kennzeichnet den Wert unter Ruhebedingungen, "Stimulation" den Wert nach Substratapplikation; *: $p < 0.5$; * *: $p < 0.01$; * * *: $p < 0.001$; n.s. = nicht signifikant.

3.2 Hitze induzierte Ströme in ARPE19-Zellen

Ziel

In der nächsten Versuchsreihe wurde der Einfluss von Hitze auf ARPE19-Zellen untersucht. Hitze gilt als direkter Aktivator einiger Ionenkanäle, darunter auch TRPV2.

Ablauf

Die Zellen wurden mit erhitzter Extrazellulärlösung stimuliert. Die Temperatur betrug min. 45°C. Dies ist der Schwellenwert, um die TRPV2-Kanäle zu aktivieren. Nach dem Hitzeimpuls kam es nach durchschnittlich 12.4 sek \pm 0.9 (n=8) zur Zunahme der Stromdichte. Die maximale Reizantwort war schwer zu bestimmen. Durch die Hitze nahm die Stabilität des Patches ab. In zwei von acht Experimenten kam es 63.5 sek \pm 3.5 nach Hitzeapplikation zu einem Verlust des Patches aufgrund von Membraninstabilität oder Leaks. Somit wurde stets der Wert als Reizantwort verwertet, der 25 Sekunden nach Hitzeapplikation gemessen wurde, da man hier noch davon ausgehen konnte, dass die gemessene Stromantwort auf die Aktivität einzelner Ionenkanäle zurückzuführen und nicht durch Leakströme oder Membraninstabilität bedingt war. Dies galt auch für alle folgenden Versuche, in denen mit Hitze stimuliert wurde. Die Temperatur der erwärmten Badlösung entsprach durchschnittlich 48.1°C \pm 1.1.

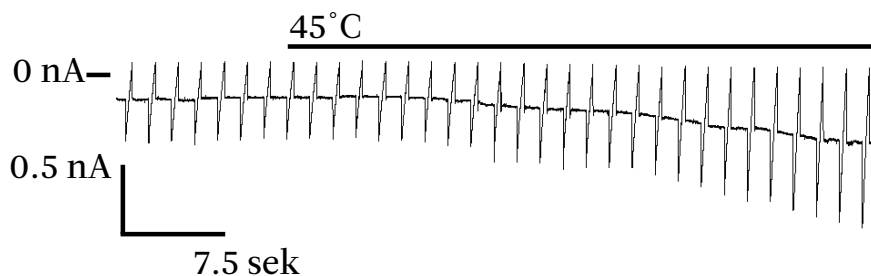


Abbildung 3.2: Untersuchung der Wirkung von Hitze (45°C) auf ARPE19-Zellen unter Verwendung des Rampenprotokolls. Es zeigten sich signifikante Veränderungen der Stromdichten, Haltepotentiale, sowie Umkehrpotentiale.

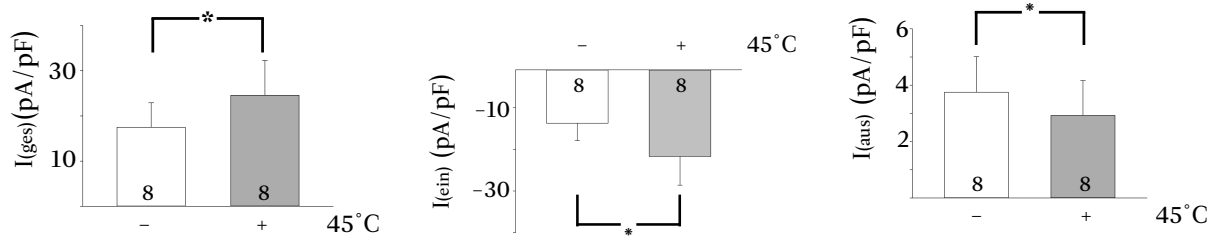


Abbildung 3.3: Vergleich der absoluten Stromdichten, vor und nach Hitzeapplikation. Die linke Abbildung bildet die Gesamtstromdichte ab, während die Mittige die Einwärtsstromdichte und die Rechte die Auswärtsstromdichte darstellt. Die Balken entsprechen dabei den aus den Versuchen errechneten Mittelwerten mitsamt Standardfehlerabweichung. Die Ziffer innerhalb des Balkens entspricht der Zellzahl, die Beschriftung unterhalb der Balken kennzeichnet die verwendeten Substrate

Ergebnis

Durch die Versuche konnte bestätigt werden, dass Hitze Ströme in ARPE19-Zellen induziert. Die Analyse der Stromdichten ergab eine signifikante Zunahme der Gesamtstromdichte um $37.7\% \pm 6.3$ ($p=0.026$) ($n=8$). Außerdem stieg die Einwärtsstromdichte um $61.3\% \pm 17.7$ ($p=0.03$) an, während die Auswärtsstromdichte um $11.7\% \pm 10.8$ abnahm. Die Differenz war aufgrund der niedrigen Stromdichten gering und lag bei $\Delta J = 0.8 \text{ pApF}^{-1}$.

Eine Stromantwort war allerdings nicht immer nach erfolgter Hitzeapplikation messbar. Insgesamt zeigte sich bei 14 von 23 gemessenen Zellen eine Veränderung der Leitfähigkeit nach Hitzeapplikation. In 9 Fällen blieb diese jedoch aus (39%).

Zusammenfassung

Hitze vermag es, die Leitfähigkeit von ARPE19-Zellen, zu steigern. Die Stromdichten sind nochmals in Abbildung 3.3 abgebildet. Abbildung 3.2 zeigt ein Stimulationsprotokoll aus der Versuchsreihe, 3.4 ein Strom-Spannungs-Diagramm. Tabelle 3.2 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse.

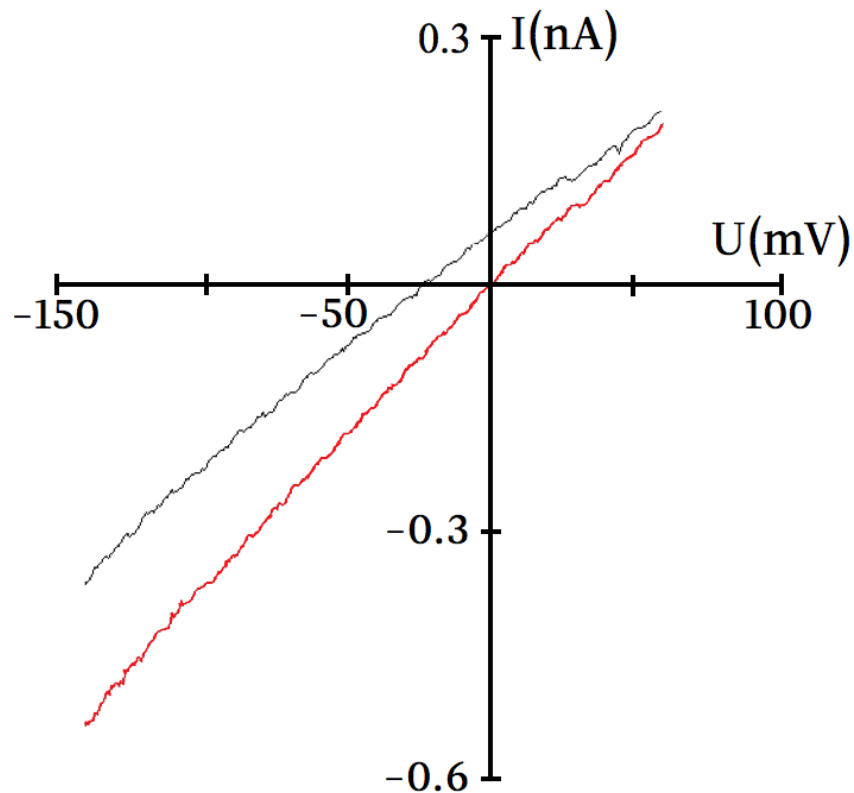


Abbildung 3.4: Strom-Spannungs-Diagramm einer ARPE19-Zelle mit Abbildung des Ruheverlaufs (schwarz), sowie dem Verlauf nach Hitze Stimulation (rot).

Verwendete Aktivatoren	Wärme (45°C)
Verwendete Inhibitoren	-
Anzahl untersuchter Zellen	8
J_{gesamt} Kontrolle (pApF ⁻¹)	17.5 ± 5.4
J_{gesamt} Stimulation (pApF ⁻¹)	24.6 ± 7.7
Steigerung (%)	37.7 ± 6.3
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	7.1 ± 2.3
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.026 (*)
$J_{einwärts}$ Kontrolle (pApF ⁻¹)	-13.7 ± 4.2
$J_{einwärts}$ Stimulation (pApF ⁻¹)	-21.7 ± 6.8
Steigerung (%)	61.3 ± 17.7
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	-8 ± 2.6
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.023 (*)
$J_{auswärts}$ Kontrolle (pApF ⁻¹)	3.7 ± 1.2
$J_{auswärts}$ Stimulation (pApF ⁻¹)	2.9 ± 1.2
Steigerung (%)	-11.7 ± 10.8
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	-0.8 ± 0.0
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.03 (*)
E_{rev} Kontrolle (mV)	0.3 ± 6.3
E_{rev} Stimulation (mV)	10.1 ± 5.8
$\Delta E_{rev} = E_{Stim.} - E_{Kontr.}$ (mV)	9.8 ± 0.53
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.002 (* *)
J_{hold} Kontrolle (mV)	-105.0 ± 22.1
J_{hold} Stimulation (mV)	-186.6 ± 51.9
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (mV)	-81.6 ± 29.9
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.03 (*)

Tabelle 3.2: Überblick über Experimente in denen die Wirkung von Hitze (45°C) auf ARPE19-Zellen untersucht wurde. Verwendete Abkürzungen: J_{gesamt} = Gesamtstromdichte; $J_{einwärts}$ = Einwärtsstromdichte; $J_{auswärts}$ = Auswärtsstromdichte; ΔJ = Stromdichtendifferenz; J_{hold} = Haltepotential; "Kontrolle" kennzeichnet den Wert unter Ruhebedingungen, "Stimulation" den Wert nach Substratapplikation; *: $p < 0.5$; * *: $p < 0.01$; * * *: $p < 0.001$; n.s. = nicht signifikant.

3.3 Pharmakologie der Hitze induzierten Ströme

Ziel

Die Versuche aus 3.2 hatten bewiesen, dass es möglich ist, Ströme in ARPE19-Zellen mittels Hitze zu induzieren. Die nächste Versuchreihe sollte untersuchen, ob diese Steigerung auf TRPV2 -Kanalaktivität zurückzuführen war.

Ablauf

ARPE19-Zellen wurden 30 Sekunden mit verschiedenen Inhibitoren inkubiert, bevor sie wieder mit Hitze stimuliert wurden. Drei Inhibitoren wurden verwendet: Ruthenium Rot, Lanthan und SKF96365.

Um die Ergebnisse mit denen aus 3.2 vergleichen zu können, wurden die Experimente mit den gleichen Zeitelementen wie in 3.2 durchgeführt.

Ergebnis

Ruthenium Rot:

Ist von den verwendeten Inhibitoren der unspezifischste für TRPV2-Kanäle, da er neben diesen weitere TRPV-Kanäle, Ryanodin Rezeptoren, TRPA-, TRPC-, TASK-Kanäle etc. hemmt [126]. Dennoch konnte durch Ruthenium Rot das Spektrum möglich beteiligter Ionenkanäle eingegrenzt werden.

Ruthenium Rot ($20\mu\text{Mol}$) verhinderte eine Zunahme der Leitfähigkeit durch Hitze.

Die prozentuale Steigerung betrug nach Hitzeimpuls nur 3% ($p=0.5$) ($n=5$), mit $\Delta J = 0.2 \text{ pApF}^{-1}$. Dies spiegelte sich auch in den Ein- und Auswärtsströmen wieder, die keine signifikanten Veränderungen nach Hitzeapplikation zeigten. Ebenso wenig kam es zu Veränderungen der Umkehr- und Haltepotentiale. Eine Übersicht der Werte stellt Tabelle 3.3 dar.

Interessant war neben den Vor- und Nachher Vergleichen innerhalb des Experiments auch der Vergleich zu den Experimenten aus 3.2:

Werden die prozentualen Steigerungen verglichen, zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen alleiniger Hitzewirkung ($37.7\% \pm 6.3$ ($n=8$)) und zusätzlicher Ruthenium Rot Inkubation ($12.4\% \pm 5.4$ ($n=5$)) von $p= 0.001$ (*) (s. Tabelle 3.8). Ebenso war die Steigerung der Einwärtsstromdichten (61.3 ± 17.7 vs. 7.2 ± 7.3) signifikant unterschiedlich mit $p= 0.04$ (*). In den Versuchen mit Ruthenium Rot kam es zu einer Abnahme der Auswärtsstromdichte, die ähnlich groß war, wie durch reine Hitzewirkung, sodass verglichen mit den Werten aus den Versuchen aus 3.2 keine signifikante Veränderung festzustellen war $p= 0.22$ (n.s.).

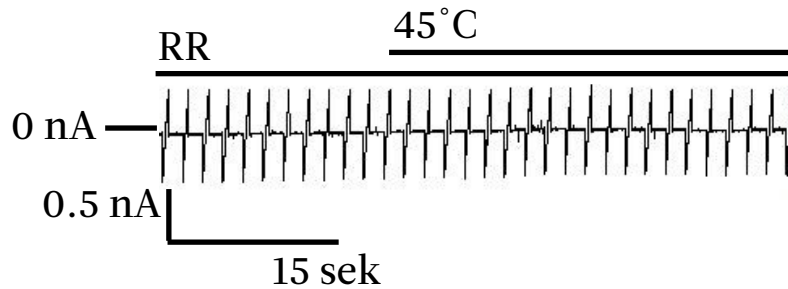


Abbildung 3.5: Untersuchung der Wirkung von Hitze (45°C) auf ARPE19-Zellen unter Verwendung des Rampenprotokolls, mit vorheriger Inkubation mit Ruthenium Rot ($20\mu\text{Mol}$). Es zeigten sich signifikante Veränderungen der Stromdichten, Haltepotentiale, sowie Umkehrpotentiale.

Lanthan:

In der nächsten Versuchsreihe wurde die Wirkung des Inhibitors Lanthan ($100\mu\text{Mol}$) untersucht. Lanthan ist ebenso wie Ruthenium Rot ein unspezifischer Hemmstoff für TRP-Kanäle, jedoch bleiben TRPV1-Kanäle durch Lanthan unbeeinflusst [71, 126]. Dieser Unterschied ist relevant, da die Möglichkeit gegeben war, durch Hitze die TRPV1-Kanäle zu aktivieren. Deren Aktivierungsschwelle liegt etwas tiefer (43°C), sodass eine Überlagerung von TRPV1- und TRPV2-Strömen nicht auszuschließen war. Außerdem besitzt der zuvor verwendete Inhibitor Ruthenium Rot ein sehr breites Spektrum hemmbarer Ionenkanäle, sodass durch Lanthan die möglicherweise beteiligten Ionenkanäle etwas eingegrenzt werden konnten.

Durch Inkubation mit Lanthan konnten hitzeinduzierte Ströme blockiert werden.

Lanthan reduzierte die Stromdichte auf Werte unterhalb des Ruhewerts: Abnahme der Stromdichte = $-5.8\% \pm 4.2$ ($n=5$), mit $\Delta J = 0.04 \pm 0.5 \text{ pApF}^{-1}$. Der Unterschied blieb jedoch nicht signifikant. Lediglich die Haltepotentiale nahmen um $\Delta J = -12.8 \pm 1.4 \text{ pA}$ ab und waren vom Ruhewert signifikant unterschiedlich mit $p = 0.04$ (*) ($n=5$). (Übersicht s. Tabelle 3.3)

Verglichen mit den Experimenten aus 3.2 (Hitzewirkung) kam man zu folgenden Ergebnissen: Lanthan hemmt die Hitzewirkung signifikant. So kam es unter Hitzewirkung (ohne Lanthan) zu einer Steigerung von $37.7\% \pm 6.3$ ($n=8$), während eine vorherige Inkubation mit Lanthan zu einer Abnahme von $5.8\% \pm 4.2$ ($n=5$) führte. Dies entspricht einem Unterschied von $p = 0.0004$ (***) (s. Abbildung 3.8). Auch die Steigerungen der Einwärtsströme unterschieden sich signifikant voneinander $p = 0.01$ (*), während die übrigen Werte (Auswärtsstromdichte, Halte- und Umkehrpotential) keinen signifikanten Unterschied zeigten. Tabelle 3.3 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse.

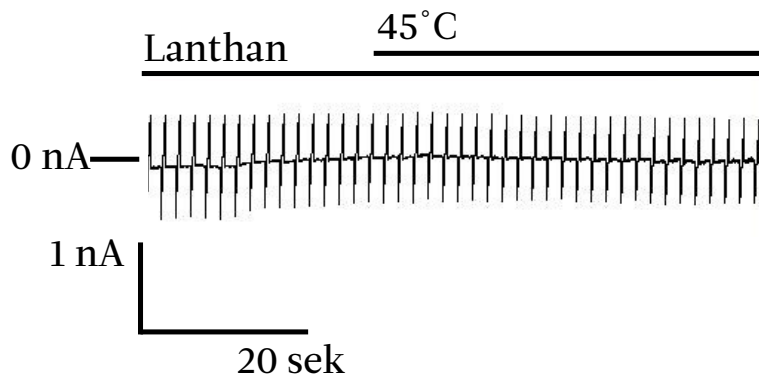


Abbildung 3.6: Untersuchung der Wirkung von Hitze (45°C) auf ARPE19-Zellen unter Verwendung des Rampenprotokolls, mit vorheriger Inkubation mit Lanthan (100 μ Mol). Es zeigten sich signifikante Veränderungen der Stromdichten, Haltepotentiale, sowie Umkehrpotentiale.

SKF96365:

Von den verwendeten Inhibitoren war SKF96365 (20 μ Mol) der spezifischste für TRPV2-Kanäle, da SKF96365 mit hoher Affinität TRPV2-Kanäle hemmt und geringen Einfluss auf andere Ionenkanäle hat [126, 58]. Durch SKF96365 sollte die Stromdichtenzunahme durch Hitze direkt auf TRPV2-Kanalaktivität zurückgeführt werden können, nachdem durch die vorherigen Experimente die Anzahl möglich beteiligter Ionenkanäle stark eingegrenzt wurde.

Nach Inkubation der ARPE19-Zellen mit SKF96365 und späterem Hitzeimpuls kam es zu keinem signifikanten Anstieg in der Gesamtleitfähigkeit der Zellen $\Delta J = -0.2 \pm 0.2$, Steigerung (%) = -5.1 ± 5.5 (n=4). Ebenso unterschieden sich die Werte für Ein- und Auswärtsstromdichten, sowie Halte- und Umkehrpotential nicht signifikant voneinander.

Dass SKF96365 die Hitzewirkung inhibiert, zeigt nochmals der Quervergleich zu 3.2: Der Vergleich der Gesamtstromdichten ergab einen Unterschied mit Signifikanzniveau von $p = 0.0015$ (*), auch die Einwärtsstromdichten zeigten einen signifikanten Unterschied ($p = 0.03$ (*)). Durch SKF96365 kam es zur Abnahme der Einwärtsströme $\Delta J = 0.01 \pm 0.0$, unterschied sich jedoch nicht signifikant von den Werten aus 3.2.

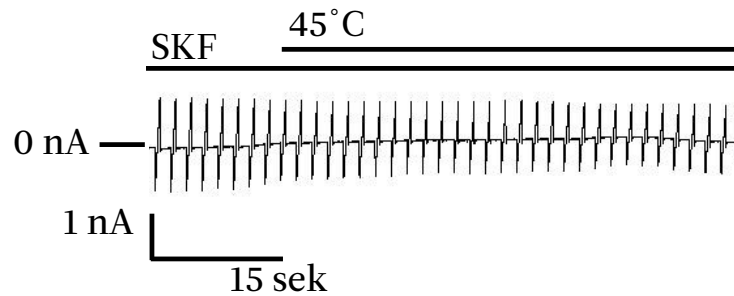


Abbildung 3.7: Untersuchung der Wirkung von Hitze (45°C) auf ARPE19-Zellen unter Verwendung des Rampenprotokolls, mit vorheriger Inkubation mit SKF96365 (20µMol). Es zeigten sich signifikante Veränderungen der Stromdichten, Haltepotentiale, sowie Umkehrpotentiale.

Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte in allen 3 Versuchsreihen (Ruthenium Rot, Lanthan, SKF96365), ein Anstieg der Stromdichte durch Hitze einwirkung verhindert werden. Dabei stieg die Spezifität der Inhibitoren für TRPV2-Kanäle stetig an (SKF96365 > Lanthan > Ruthenium Rot). Die verwendeten Pharmaka entsprechen dem pharmakologischen Profil der TRPV2-Kanäle. Dies macht die Aktivität von TRPV2-Kanälen wahrscheinlich. Abbildung 3.8 stellt nochmals graphisch die prozentualen Stromdichtensteigerungen nach Hitzeapplikation mit vorheriger Inkubation der Inhibitoren dar. Tabelle 3.3 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse.

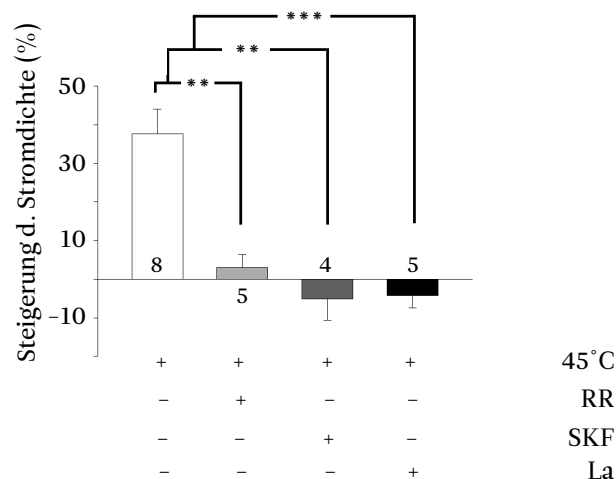


Abbildung 3.8: Vergleich der Steigerung der Stromdichten, vor und nach Hitzeapplikation, sowie unter Verwendung der drei Inhibitoren. Die Balken entsprechen dabei den aus den Versuchen errechneten Mittelwerten mitsamt Standardfehlerabweichung. Die Ziffer innerhalb des Balkens entspricht der Zellzahl, die Beschriftung unterhalb der Balken kennzeichnet die verwendeten Substrate.

Verwendete Aktivatoren	Wärme (45°C)		
Verwendete Inhibitoren	Ruthenium Rot	SKF96365	Lanthan
Anzahl untersuchter Zellen	5	4	5
J_{gesamt} Kontrolle (pApF ⁻¹)	12.4 ± 5.4	10.4 ± 3.3	13.97 ± 6.9
J_{gesamt} Stimulation (pApF ⁻¹)	12.6 ± 5.7	10.2 ± 3.5	13.93 ± 7.4
Steigerung (%)	3.0 ± 3.4	-5.1 ± 5.5	-5.8 ± 4.2
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	0.2 ± 0.3	-0.2 ± 0.2	-0.04 ± 0.5
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.5 (n.s.)	0.5 (n.s.)	0.9 (n.s.)
$J_{einwärts}$ Kontrolle (pApF ⁻¹)	9.2 ± 4.3	7.8 ± 2.3	11.2 ± 5.6
$J_{einwärts}$ Stimulation (pApF ⁻¹)	9.5 ± 4.2	7.6 ± 2.4	11.1 ± 5.6
Steigerung (%)	7.2 ± 7.3	-3.1 ± 6.9	-2.9 ± 2.7
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	0.3 ± 0.1	-0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.3 (n.s.)	0.6 (n.s.)	0.2 (n.s.)
$J_{auswärts}$ Kontrolle (pApF ⁻¹)	3.2 ± 1.6	2.6 ± 1.0	2.6 ± 1.3
$J_{auswärts}$ Stimulation (pApF ⁻¹)	3.0 ± 1.6	2.5 ± 1.0	3.1 ± 1.7
Steigerung (%)	-10.5 ± 13.2	-10.2 ± 10.5	-1.5 ± 15.8
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	0.1 ± 0.0	-0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.4
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.2 (n.s.)	0.7(n.s.)	0.8 (n.s.)
E_{rev} Kontrolle (mV)	9.16 ± 7.3	11.0 ± 9.7	11.8 ± 4.0
E_{rev} Stimulation (mV)	12.6 ± 5.4	-6.1 ± 10.5	11.1 ± 3.5
$\Delta E_{rev} = E_{Stim.} - E_{Kontr.}$ (mV)	3.4 ± 2.3	4.9 ± 0.8	-0.7 ± 0.5
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.1 (n.s.)	0.3 (n.s.)	0.5 (n.s.)
J_{hold} Kontrolle (mV)	-60.9 ± 24.9	-49.7 ± 10.0	-116 ± 48.3
J_{hold} Stimulation (mV)	-78.0 ± 26.2	-42.7 ± 4.3	-129 ± 46.9
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (mV)	17.4 ± 2.7	7.0 ± 5.7	-12.8 ± 1.4
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.05 (n.s.)	0.3(n.s.)	0.04 (*)

Tabelle 3.3: Überblick über Experimente in denen die Wirkung von Hitze (45°C) auf ARPE19-Zellen untersucht wurde nach vorheriger Inkubation mit einem Inhibitor (Ruthenium Rot (20μMol), SKF96365 (20μMol), Lanthan (100μMol)). Verwendete Abkürzungen: J_{gesamt} = Gesamtstromdichte; $J_{einwärts}$ = Einwärtsstromdichte; $J_{auswärts}$ = Auswärtsstromdichte; ΔJ = Stromdichtendifferenz; J_{hold} = Haltepotential; "Kontrolle" kennzeichnet den Wert unter Ruhebedingungen, "Stimulation" den Wert nach Substratapplikation; *: p < 0.5; *: *: p < 0.01; *: *: *: p < 0.001; n.s. = nicht signifikant.

3.4 PI3-Kinase abhängige Hitzeströme

Ziel

Nachdem in 3.2 - 3.3 gezeigt werden konnte, dass TRPV2-Kanäle in ARPE19-Zellen durch Hitzeimpulse aktiviert werden können, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob diese Aktivierung abhängig ist von einem PI3-Kinase-Signalweg.

Ablauf

Ähnlich wie in den Experimenten aus 3.3 wurden ARPE19-Zellen 30 Sekunden mit LY294002 (30 μ) inkubiert, bevor sie mit Hitze stimuliert wurden. LY294002 ist ein direkter Inhibitor des intrazellulären PI3-Kinase-Signalwegs. Folgende Zeitpunkte wurden für die Auswertung der Ströme festgelegt: Als Ruhestrom galt der Strom vor Applikation von LY294002. Nach Hitzeapplikation wurde der Strom als Reizantwort gewertet, der 25 Sekunden nach Hitzeapplikation gemessen wurde (s. 3.2).

Ergebnis

Wie Tabelle 3.4 zeigt, konnte durch LY294002 ein Anstieg der Stromdichte unterdrückt werden. Es kam lediglich zu einem Anstieg der Stromdichte um ΔJ (pApF⁻¹) = 0.8 ± 0.6 (n=5). Dies entsprach einer prozentualen Zunahme von $0.4 \% \pm 0.1$. Die Unterschiede lagen nicht im signifikanten Bereich. Gleiches wiederholte sich bei Analyse der Ein- und Auswärtsstromdichte.

Wieder wurden die prozentualen Steigerungen der alleinigen Hitzewirkung mit den Steigerungen nach vorheriger LY294002 Inkubation verglichen. Die Steigerungen der Gesamtstromdichten ($37.7 \text{ pApF}^{-1} \pm 6.3$ (n=8) vs. $0.4 \text{ pApF}^{-1} \pm 2.1$ (n=5)) zeigen dabei einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert = 0.0009 (* *) (s. Abbildung 3.10). Gleiches wiederholte sich beim Vergleich der Steigerungen der Einwärtsstromdichten ($61.3 \text{ pApF}^{-1} \pm 17.7$ vs. 2.8 (n=8) $\text{pApF}^{-1} \pm 2.5$ (n=5)) das Signifikanzniveau entsprach $p = 0.025$ (*). Die prozentuale Abnahme der Auswärtsstromdichten unterschied sich nicht signifikant voneinander ($p=0.3$).

Zusammenfassung

Durch LY294002 kann ein Anstieg der Leitfähigkeit durch Hitze unterbunden werden. Daher scheint die Aktivität der TRPV2-Kanäle der PI3-Kinase Aktivität zu unterliegen.

Durch die Experimente (3.2 - 3.4) konnte bewiesen werden, dass es (1) möglich ist durch Hitze Ströme in ARPE19-Zellen zu induzieren (3.2). (2) Diese Ströme sind auf TRPV2-Kanäle zurückzuführen (3.3). (3) Unterliegt die Aktivität dieser Kanäle einem PI3-Kinase Mechanismus (3.4).

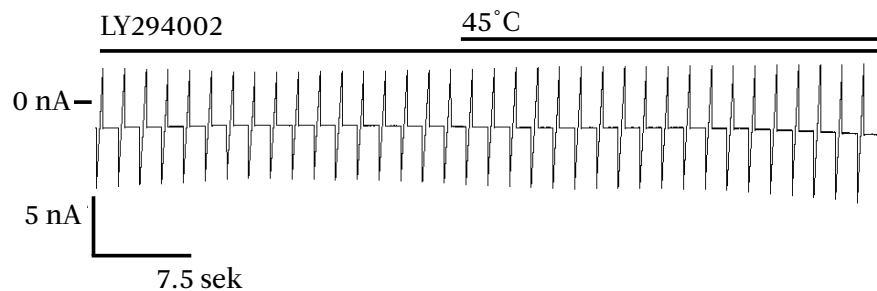


Abbildung 3.9: Untersuchung der Wirkung von Hitze (45°C) auf ARPE19-Zellen unter Verwendung des Rampenprotokolls, mit vorheriger Inkubation mit LY294002 (30 μ Mol). Es zeigten sich keine signifikante Veränderungen der Stromdichten, Haltepotentiale, sowie Umkehrpotentiale.

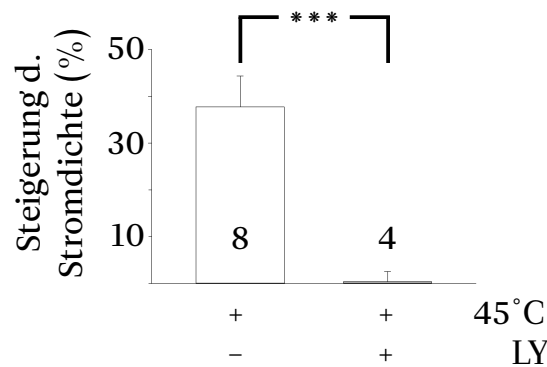


Abbildung 3.10: Vergleich der Steigerung der Stromdichten, vor und nach Hitzeapplikation, mit und ohne vorherige Inkubation von LY294002 (30 μ Mol). Die Balken entsprechen dabei den aus den Versuchen errechneten Mittelwerten mitsamt Standardfehlerabweichung. Die Ziffer innerhalb des Balkens entspricht der Zellzahl, die Beschriftung unterhalb der Balken kennzeichnet die verwendeten Substrate.

Verwendete Aktivatoren	-	Wärme (45°C)
Verwendete Inhibitoren	LY294002	
Anzahl untersuchter Zellen	5	
J_{gesamt} Kontrolle (pApF ⁻¹)	16.3 ± 8.4	
J_{gesamt} Stimulation (pApF ⁻¹)	15.9 ± 8.2	17.1 ± 9.0
Steigerung (%)	-2.5 ± 0.7	4.0 ± 2.1
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	0.4 ± 0.2	0.8 ± 0.6
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.1 (n.s.)	0.3 (n.s.)
$J_{einwärts}$ Kontrolle (pApF ⁻¹)	12.5 ± 6.4	
$J_{einwärts}$ Stimulation (pApF ⁻¹)	11.5 ± 6.1	12.5 ± 6.7
Steigerung (%)	-8.0 ± 1.4	0.0 ± 2.5
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	1.0 ± 0.3	0.0 ± 0.3
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.3 (n.s.)	0.4 (n.s.)
$J_{auswärts}$ Kontrolle (pApF ⁻¹)	4.3 ± 2.0	
$J_{auswärts}$ Stimulation (pApF ⁻¹)	4.3 ± 2.0	4.5 ± 2.2
Steigerung (%)	-0.1 ± 2.1	4.0 ± 3.8
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	0.1 ± 0.2	0.4 ± 0.5
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.1 (n.s.)	0.08 (n.s.)
E_{rev} Kontrolle (mV)	1.9 ± 5.7	
E_{rev} Stimulation (mV)	3.0 ± 4.5	6.9 ± 4.5
$\Delta E_{rev} = E_{Stim.} - E_{Kontr.}$ (mV)	1.1 ± 1.2	5.0 ± 1.2
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.4 (n.s.)	0.052 (n.s.)
J_{hold} Kontrolle (mV)	0.02 ± 7.2	
J_{hold} Stimulation (mV)	0.4 ± 6.3	0.8 ± 7.6
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (mV)	0.3 ± 0.9	0.7 ± 0.4
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.7 (n.s.)	0.5 (n.s.)

Tabelle 3.4: Überblick über Experimente in denen die Wirkung von Hitze (45°C) auf ARPE19-Zellen untersucht wurde nach vorheriger Inkubation mit LY294002 (30µMol). Verwendete Abkürzungen: J_{gesamt} = Gesamtstromdichte; $J_{einwärts}$ = Einwärtsstromdichte; $J_{auswärts}$ = Auswärtsstromdichte; ΔJ = Stromdichtendifferenz; J_{hold} = Haltepotential; "Kontrolle" kennzeichnet den Wert unter Ruhebedingungen, "Stimulation" den Wert nach Substratapplikation; *: p <0.5; *: p <0.01; * *: p <0.001; n.s. = nicht signifikant

3.5 Cannabidiol induzierte Ströme in ARPE19-Zellen

Ziel

In den Versuchen sollte untersucht werden, ob Cannabidiol die Leitfähigkeit von ARPE19-Zellen steigern kann.

Ablauf

ARPE19-Zellen wurden zunächst mit Cannabidiol ($45\mu\text{Mol}$) inkubiert und im nächsten Schritt mit Hitze stimuliert. So sollte überprüft werden, ob die vorherige Inkubation mit Cannabidiol zu einem stärkeren Anstieg der Leitfähigkeit führt, als durch alleinigen Hitzeimpuls.

Problematisch bei dieser Versuchsreihe war die lange Inkubationszeit, die Cannabidiol benötigte um Einfluss auf die Leitfähigkeit der Zellen zu nehmen (240 Sekunden). In nahezu allen Vorversuchen kam es zum Verlust des Patches oder Verlust der Membranstabilität, sodass der Versuch abgebrochen wurde. Deshalb wurden die Zellen zunächst mit Cannabidiol inkubiert und nach 120-180 Sekunden gepatcht. 300 Sekunden nach der Cannabidiol Inkubation wurden die Zellen mittels Hitze stimuliert.

So konnte jedoch kein absoluter Ruhewert für die Leitfähigkeit bestimmt werden. Sobald das Stimulationsprotokoll gestartet wurde, war Cannabidiol bereits in der Extrazellulärlösung. Deshalb wurden die Ströme als Ruhewerte gewertet, die dann messbar waren, als sich das Cannabidiol bereits in der Extrazellulärlösung befand.

Ergebnis

Nach Inkubation mit Cannabidiol kam es unter Hitzewirkung zu einer deutlichen Zunahme der Stromdichte. Die Stromdichte stieg signifikant an ($p = 0.007$ (* *)) bei einem ΔJ (pApF^{-1}) = 26.3 ± 6.3 ($n=5$) (s. Abbildung 3.12). Ähnlich verhielten sich Ein- und Auswärtsstromdichten, wobei das Signifikanzniveau geringer war, als beim Vergleich der Gesamtstromdichten ($p = 0.04$ (*) bzw. 0.01 (*)). Ebenso unterschieden sich Umkehr- und Haltepotentiale voneinander (s. Tabelle 3.5).

Der Quervergleich zu den Ergebnissen aus 3.2 sollte zeigen, ob durch Cannabidiol die alleinige Hitzewirkung zusätzlich gesteigert werden kann:

Die Gesamtstromdichte stieg um $115.3 \% \pm 32.8$ ($n=5$), während sie durch alleinige Hitzewirkung um lediglich $37.7 \% \pm 6.3$ ($n=8$) anstieg. Dies entsprach $p = 0.007$ (* *) (s. Abbildung 3.14).

Ähnliche Signifikanz zeigte sich beim Vergleich der Ein- und Auswärtsstromdichten. Die Einwärtsstromdichte stieg nach vorheriger Cannabidiol Inkubation um 140.7%

± 36.3 (n=5), während sie durch alleinige Hitzewirkung $61.3\% \pm 17.7$ (n=8) anstieg. Dies entsprach $p = 0.04$ (*).

Die Einwärtsstromdichte stieg nach vorheriger Cannabidiol Inkubation um $33.0\% \pm 5.0$ (n=5), während sie durch alleinige Hitzewirkung $11.7\% \pm 10.8$ (n=8) entsprach. Dies entsprach $p = 0.01$ (*).

Zusammenfassung

Durch Cannabidiol konnte die Wirkung von Hitze zusätzlich gesteigert werden. Offen bleibt, ob es allein durch Cannabidiol zur Zunahme der Stromdichte kommt. Abbildung 3.11 zeigt einen exemplarischen Membranstrom unter Einfluss von Cannabidiol und Hitze, 3.13 zeigt ein Strom-Spannungs-Diagramm.

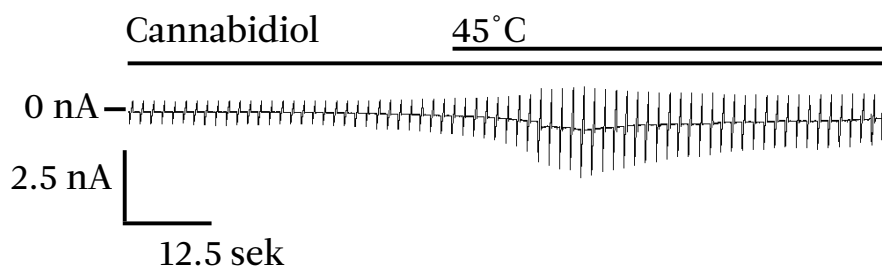


Abbildung 3.11: Untersuchung der Wirkung von Hitze (45°C) und Cannabidiol ($45\mu\text{Mol}$) auf ARPE19-Zellen unter Verwendung des Rampenprotokolls. Es zeigten sich signifikante Veränderungen der Stromdichten, Haltepotentiale, sowie Umkehrpotentiale.

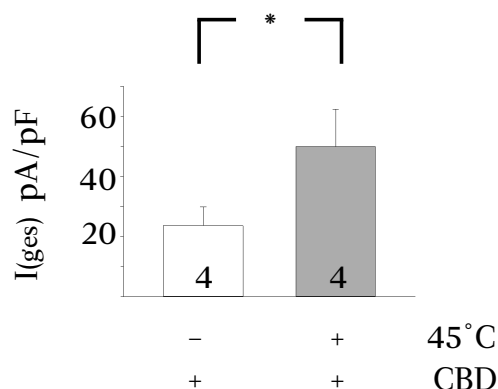


Abbildung 3.12: Vergleich der Steigerung der Stromdichten, vor und nach Hitzeapplikation, mit vorheriger Inkubation von Cannabidiol ($45\mu\text{Mol}$). Die Balken entsprechen dabei den aus den Versuchen errechneten Mittelwerten mitsamt Standardfehlerabweichung. Die Ziffer innerhalb des Balkens entspricht der Zellzahl, die Beschriftung unterhalb der Balken kennzeichnet die verwendeten Substrate.

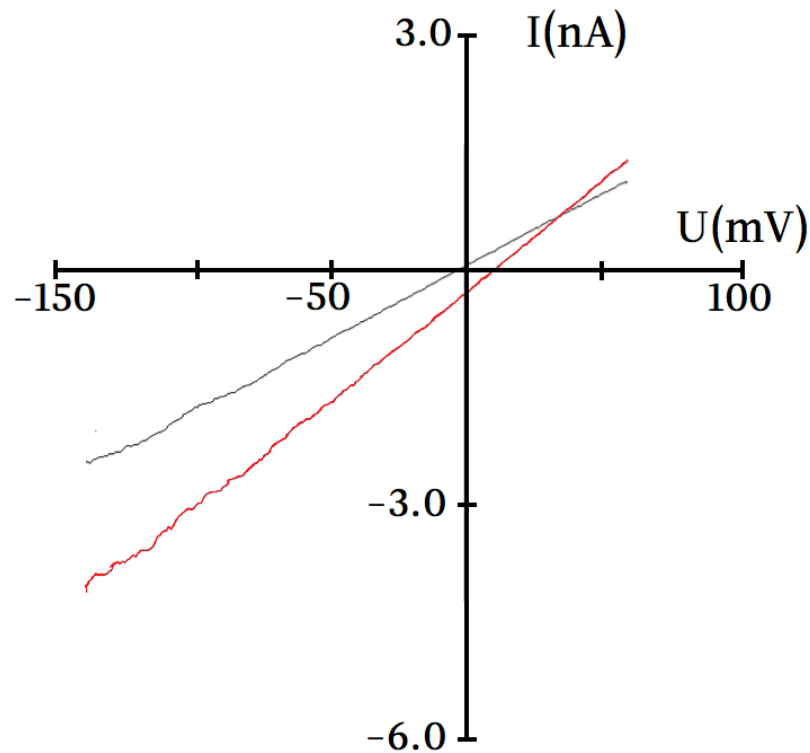


Abbildung 3.13: Strom-Spannungs-Diagramm einer ARPE19-Zelle mit Abbildung des Verlaufs nach Cannabidiol Inkubation (schwarz), sowie nach zusätzlicher Hitze (45°C) Stimulation (rot).

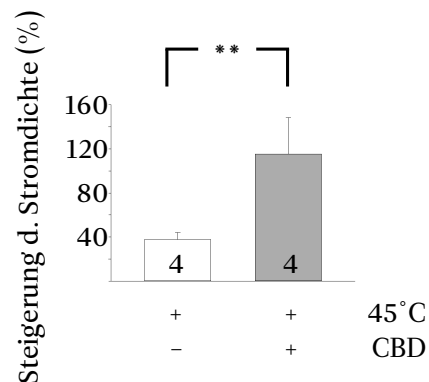


Abbildung 3.14: Vergleich der Steigerung der Stromdichten, vor und nach Hitzeapplikation, mit und ohne vorherige Inkubation von Cannabidiol. Die Balken entsprechen dabei den aus den Versuchen errechneten Mittelwerten mitsamt Standardfehlerabweichung. Die Ziffer innerhalb des Balkens entspricht der Zellzahl, die Beschriftung unterhalb der Balken kennzeichnet die verwendeten Substrate.

Verwendete Aktivatoren	Wärme (45°C)
	Cannabidiol
Anzahl untersuchter Zellen	4
J_{gesamt} Kontrolle (pApF ⁻¹)	23.5 ± 6.2
J_{gesamt} Stimulation (pApF ⁻¹)	49.8 ± 12.5
Steigerung (%)	115.3 ± 32.8
$\Delta J = J_{stim.} - J_{kontr.}$ (pApF ⁻¹)	26.3 ± 6.3
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.007 (* *)
$J_{einwärts}$ Kontrolle (pApF ⁻¹)	-16.5 ± 4.2
$J_{einwärts}$ Stimulation (pApF ⁻¹)	-39.9 ± 10.3
Steigerung (%)	140.7 ± 36.3
$\Delta J = J_{stim.} - J_{kontr.}$ (pApF ⁻¹)	-23.4 ± 6.1
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.04 (*)
$J_{auswärts}$ Kontrolle (pApF ⁻¹)	8.4 ± 1.9
$J_{auswärts}$ Stimulation (pApF ⁻¹)	11.1 ± 2.4
Steigerung (%)	33.0 ± 5.0
$\Delta J = J_{stim.} - J_{kontr.}$ (pApF ⁻¹)	2.7 ± 1.5
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.01 (*)
E_{rev} Kontrolle (mV)	2.3 ± 1.8
E_{rev} Stimulation (mV)	13.2 ± 4.4
$\Delta E_{rev} = E_{stim.} - E_{kontr.}$ (mV)	8.9 ± 2.6
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.04 (*)
J_{hold} Kontrolle (mV)	-260 ± 76.3
J_{hold} Stimulation (mV)	-646.8 ± 211.3
$\Delta J = J_{stim.} - J_{kontr.}$ (mV)	386.4 ± 135.0
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.04 (*)

Tabelle 3.5: Überblick über Experimente in denen die Wirkung von Hitze (45°C) auf ARPE19-Zellen untersucht wurde nach vorheriger Inkubation mit Cannabidiol (45µMol). Verwendete Abkürzungen: J_{gesamt} = Gesamtstromdichte; $J_{einwärts}$ = Einwärtsstromdichte; $J_{auswärts}$ = Auswärtsstromdichte; ΔJ = Stromdichtendifferenz; J_{hold} = Haltepotential; "Kontrolle" kennzeichnet den Wert unter Ruhebedingungen, "Stimulation" den Wert nach Substratapplikation; *: p < 0.5; * *: p < 0.01; * * *: p < 0.001; n.s. = nicht signifikant

3.6 Pharmakologie der Cannabidiol induzierten Ströme

Ziel

Nachdem in 3.5 gezeigt werden konnte, dass Cannabidiol die Zelleitfähigkeit steigert, sollte analysiert werden, ob dies auf TRPV2-Kanalaktivität beruht.

Ablauf

Als Inhibitor wurde SKF9635 verwendet. SKF9635 ist der spezifischste der zuvor verwendeten Inhibitoren, so dass bei Wirksamkeit davon ausgegangen werden konnte, dass vor allem TRPV2-Kanäle die Zelleitfähigkeit steigerten. Die Versuche liefen ähnlich ab wie in 3.5: Zeitgleich mit Cannabidiol ($45\mu\text{Mol}$) wurden die Zellen mit SKF9635 ($20\mu\text{Mol}$) inkubiert. Wieder wurden die Zellen 120-180 Sekunden nach Beginn der Inkubation gepatcht. Nach 300 Sekunden wurden die Zellen mit Hitze stimuliert. In der erhitzten Extrazellulärlösung war auch Cannabidiol und SKF9635 gelöst. Wieder galten die Ströme 25 Sekunden nach Inkubation mit erhitzter Lösung als Reizantwort. Als Ruhewerte wurden die Ströme gewertet, die vor Hitzeimpuls messbar waren.

Ergebnis

Durch SKF9635 konnte ein Anstieg der Stromdichte verhindert werden. Erstaunlicherweise kam es sogar zu einer Abnahme der Stromdichte mit $\Delta J = 0.6 \text{ pApF}^{-1} \pm 2.0$ ($n=4$), dies entsprach -2.4% . Auch bei Betrachtung der Ein- und Auswärtsanteile der Gesamtstromdichte war kein signifikanter Unterschied nach Hitzeimpuls festzustellen (s. Tabelle 3.6).

Der Quervergleich zu den Experimenten aus 3.5 sollte zeigen, dass SKF9635 die Leitfähigkeitssteigerung durch Hitze und Cannabidiol signifikant reduziert:

Während ohne Inkubation eines Inhibitors die Leitfähigkeitszunahme der Gesamtstromdichte bei $115.3\% \pm 32.8$ ($n=4$) lag, konnte sie durch SKF9635 auf $-2.4\% \pm 8.6$ ($n=4$) herabgesetzt werden. Dies entsprach $p = 0.01$ (*) (s. Abbildung 3.16). Auch die Einwärtsstromdichten ($140.7\% \pm 36.3$ ($n=4$) vs. $3.0\% \pm 7.8$ ($n=4$)) unterschieden sich signifikant voneinander ($p\text{-Wert} = 0.009$ (**)). Gleiches wiederholte sich beim Vergleich der Steigerung der Auswärtsstromdichten ($33.0\% \pm 5.0$ ($n=4$) vs. $-15.8\% \pm 11.9$ ($n=4$)), der $p\text{-Wert}$ lag bei 0.007 (**). Halte- und Umkehrpotentiale zeigten keinen signifikanten Unterschied, wobei der $p\text{-Wert}$ beim Vergleich der Haltepotentiale bei 0.057 (n.s.) lag und eventuell aufgrund der geringen Zellzahl ($n=4$) noch nicht in den signifikanten Bereich fiel.

Zusammenfassung

Durch SKF96365 konnte nachgewiesen werden, dass Cannabidiol über TRPV2-Kanalaktivität die Zelleitfähigkeit regulieren kann.

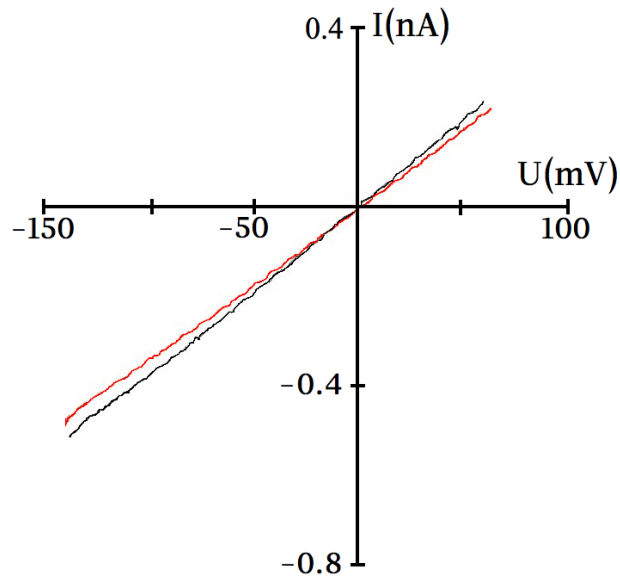


Abbildung 3.15: Strom-Spannungs-Diagramm einer ARPE19-Zelle mit Abbildung des Verlaufs nach Cannabidiol ($45\mu\text{Mol}$) und SKF96365 ($20\mu\text{Mol}$) Inkubation (schwarz), sowie nach zusätzlicher Hitze Stimulation (rot).

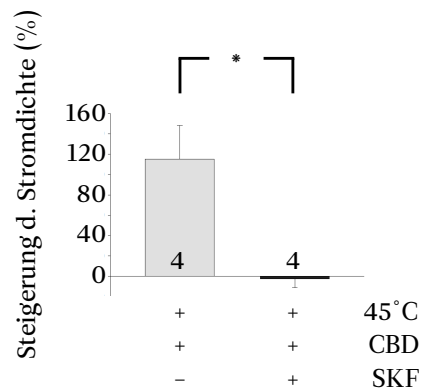


Abbildung 3.16: Vergleich der Steigerung der Stromdichten, vor und nach Hitzeapplikation mit Cannabidiol ($45\mu\text{Mol}$), mit und ohne vorherige Inkubation von SKF96365 ($20\mu\text{Mol}$). Die Balken entsprechen dabei den aus den Versuchen errechneten Mittelwerten mitsamt Standardfehlerabweichung. Die Ziffer innerhalb des Balkens entspricht der Zellzahl, die Beschriftung unterhalb der Balken kennzeichnet die verwendeten Substrate.

Verwendete Aktivatoren	Wärme (45°C)
	Cannabidiol
Verwendete Inhibitoren	SKF96365
Anzahl untersuchter Zellen	4
J_{gesamt} Kontrolle (pApF ⁻¹)	41.4 ± 10.5
J_{gesamt} Stimulation (pApF ⁻¹)	40.8 ± 12.5
Steigerung (%)	-2.4 ± 8.6
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	0.6 ± 2.0
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.9 (n.s.)
$J_{einwärts}$ Kontrolle (pApF ⁻¹)	31.6 ± 8.0
$J_{einwärts}$ Stimulation (pApF ⁻¹)	32.8 ± 10.0
Steigerung (%)	3.0 ± 7.8
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	1.2 ± 2.0
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.5 (n.s.)
$J_{auswärts}$ Kontrolle (pApF ⁻¹)	9.7 ± 2.6
$J_{auswärts}$ Stimulation (pApF ⁻¹)	8.0 ± 3.0
Steigerung (%)	-15.8 ± 11.9
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	1.7 ± 0.4
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.4 (n.s.)
E_{rev} Kontrolle (mV)	11.7 ± 2.9
E_{rev} Stimulation (mV)	19.9 ± 4.0
$\Delta E_{rev} = E_{Stim.} - E_{Kontr.}$ (mV)	8.1 ± 1.1
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.02 (*)
J_{hold} Kontrolle (mV)	-316.7 ± 67.9
J_{hold} Stimulation (mV)	-368.0 ± 104.7
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (mV)	52.0 ± 36.8
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.2 (n.s.)

Tabelle 3.6: Überblick über Experimente in denen die Wirkung von Hitze (45°C) auf ARPE19-Zellen untersucht wurde nach vorheriger Inkubation mit Cannabidiol (45µMol) und SKF96365 (20µMol). Verwendete Abkürzungen: J_{gesamt} = Gesamtstromdichte; $J_{einwärts}$ = Einwärtsstromdichte; $J_{auswärts}$ = Auswärtsstromdichte; ΔJ = Stromdichtendifferenz; J_{hold} = Haltepotential; "Kontrolle" kennzeichnet den Wert unter Ruhebedingungen, "Stimulation" den Wert nach Substratapplikation; *: p < 0.5; * *: p < 0.01; * * *: p < 0.001; n.s. = nicht signifikant

3.7 Induziert Cannabidiol PI3-Kinase abhängige Ströme?

Ziel

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Cannabidiol die Zelleitfähigkeit über TRPV2-Kanalaktivität steigern kann, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob die Regulation einem PI3-Kinase Mechanismus unterliegt.

Ablauf

Dazu wurden ARPE19-Zellen mit Cannabidiol ($45\mu\text{Mol}$) und LY294002 ($30\mu\text{Mol}$) inkubiert und nach 120-180 Sekunden gepatcht. Nach Stabilisierung des Whole Cell Modus wurden die Zellen mit Hitze stimuliert. In der erhitzten Extrazellulärlösung waren Cannabidiol ($45\mu\text{Mol}$) und LY294002 ($30\mu\text{Mol}$) gelöst. Die Messwerte wurden zu den gleichen Zeitpunkten bestimmt, wie in den Versuchen zuvor.

Ergebnis

LY294002 konnte die Stromdichtenzunahme durch Cannabidiol und Hitze verhindern. Es kam sogar zur leichten Abnahme der Stromdichte $\Delta J = -0.7 \text{ pApF}^{-1} \pm 0.0$ ($n=6$), dies entsprach $-4.2\% \pm 5.1$. Die Unterschiede zu den Ruhewerten blieben nicht signifikant. Gleiches zeigte sich beim Vergleich der Ein- und Auswärtsströme. Auch die Haltepotentiale und Umkehrpotentiale veränderten sich nur in geringem Maße. Die Werte sind Tabelle 3.7 zu entnehmen.

Der Quervergleich zu 3.5 sollte bestätigen, dass durch LY294002 die Stromdichtenzunahme ausgelöst durch Cannabidiol und Hitze signifikant reduziert werden kann, womit PI3-Kinase Abhängigkeit bestätigt wäre. Ergebnis:

Wieder wurden die prozentualen Steigerungen der Stromdichten für den Vergleich herangezogen. Dabei waren die Steigerungen der Gesamtstromstromdichten ($115.3\% \pm 32.8$ ($n=4$) vs. $-2.4\% \pm 8.6$ ($n=6$)) signifikant unterschiedlich mit $p= 0.0018$ ($**$) (s. Abbildung 3.18). Gleiches wiederholte sich beim Vergleich der Einwärtsströme ($140.7\% \pm 36.3$ ($n=4$) vs. $3.0\% \pm 7.8$ ($n=6$)) mit $p= 0.0013$ ($**$) und Auswärtsströme ($33.0\% \pm 5.0$ ($n=4$) vs. $-15.8\% \pm 11.9$ ($n=6$)), $p= 0.025$ ($*$).

Ebenso verhinderte LY294002 Veränderungen der Halte- und Umkehrpotentiale, so dass es zu einem signifikanten Unterschied zu 3.5 kam. Die Differenz der Haltepotentiale in den LY294002 Versuchen lag bei $\Delta J = 52.0\text{mV} \pm 36.8$ ($n=6$), während sie in den reinen Cannabidiol Versuchen deutlich größer war $\Delta J = 386.4\text{mV} \pm 135.0$ ($n=4$). Dieser Unterschied war signifikant mit $p= 0.0065$ ($**$). Die Differenz der Umkehrpotentiale war nicht signifikant, $p= 0.7$ (n.s.) ($\Delta E_{rev} = 8.1\text{mV} \pm 1.1$ ($n=4$) vs. $\Delta E_{rev} = 8.9\text{mV} \pm 2.6$ ($n=6$)).

Zusammenfassung

Durch die Experimente aus 3.5 bis 3.7 konnte bewiesen werden, dass es (1) möglich ist durch Cannabidiol den Effekt von Hitze auf TRPV2-Kanäle zu steigern (s. 3.5). (2) Dieser Effekt ist auch auf TRPV2-Kanalaktivität zurückzuführen (s. 3.6). Außerdem konnte (3) der Einfluss des Cannabidiols auf TRPV2-Kanäle mittels LY294002 gehemmt werden. Dies bestätigt, dass Cannabidiol über einen PI3-Kinase Mechanismus auf TRPV2-Kanäle wirkt (s. 3.7).

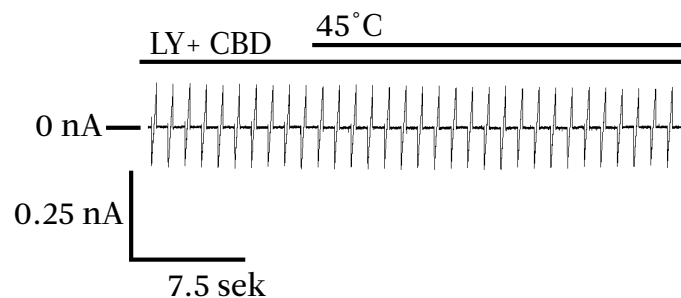


Abbildung 3.17: Untersuchung der Wirkung von Hitze (45°C) auf ARPE19-Zellen, nach Inkubation mit Cannabidiol (45µMol) und LY294002 (30µMol) unter Verwendung des Rampenprotokolls. Es zeigten sich keine signifikante Veränderungen der Stromdichten, Haltepotentiale, sowie Umkehrpotentiale.

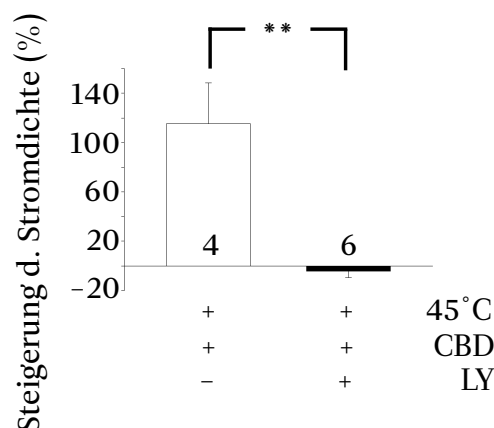


Abbildung 3.18: Vergleich der Steigerung der Stromdichten, vor und nach Hitzeapplikation mit Cannabidiol (45µMol), mit und ohne vorherige Inkubation von LY294002 (30µMol). Die Balken entsprechen dabei den aus den Versuchen errechneten Mittelwerten mitsamt Standardfehlerabweichung. Die Ziffer innerhalb des Balkens entspricht der Zellzahl, die Beschriftung unterhalb der Balken kennzeichnet die verwendeten Substrate.

Verwendete Aktivatoren	Wärme (45°C)
	Cannabidiol
Verwendete Inhibitoren	LY294002
Anzahl untersuchter Zellen	6
J_{gesamt} Kontrolle (pApF ⁻¹)	8.6 ± 1.4
J_{gesamt} Stimulation (pApF ⁻¹)	7.9 ± 1.4
Steigerung (%)	-4.2 ± 5.1
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	0.7 ± 0.0
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.2 (n.s.)
$J_{einwärts}$ Kontrolle (pApF ⁻¹)	5.5 ± 1.0
$J_{einwärts}$ Stimulation (pApF ⁻¹)	5.6 ± 1.0
Steigerung (%)	1.4 ± 4.9
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	0.1 ± 0.0
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.9 (n.s.)
$J_{auswärts}$ Kontrolle (pApF ⁻¹)	2.5 ± 0.4
$J_{auswärts}$ Stimulation (pApF ⁻¹)	2.3 ± 0.4
Steigerung (%)	-3.4 ± 10.1
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	0.2 ± 0.0
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.29 (n.s.)
E_{rev} Kontrolle (mV)	-6.7 ± 3.9
E_{rev} Stimulation (mV)	-5.7 ± 3.9
$\Delta E_{rev} = E_{Stim.} - E_{Kontr.}$ (mV)	-1.0 ± 0.0
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.3 (n.s.)
J_{hold} Kontrolle (mV)	-59.7 ± 23.3
J_{hold} Stimulation (mV)	-64.0 ± 26.0
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (mV)	-4.3 ± 2.7
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.2 (n.s.)

Tabelle 3.7: Überblick über Experimente in denen die Wirkung von Hitze (45°C) auf ARPE19-Zellen untersucht wurde nach vorheriger Inkubation mit Cannabidiol (45µMol) und LY294002 (30µMol). Verwendete Abkürzungen: J_{gesamt} = Gesamtstromdichte; $J_{einwärts}$ = Einwärtsstromdichte; $J_{auswärts}$ = Auswärtsstromdichte; ΔJ = Stromdichtendifferenz; J_{hold} = Haltepotential; "Kontrolle" kennzeichnet den Wert unter Ruhebedingungen, "Stimulation" den Wert nach Substratapplikation; *: p < 0.5; * *: p < 0.01; * * *: p < 0.001; n.s. = nicht signifikant

3.8 IGF-1 induzierte Ströme in ARPE19-Zellen

Ziel

In den nächsten Versuchen sollte untersucht werden, ob IGF-1 die Leitfähigkeit von ARPE19-Zellen über TRPV2-Kanalaktivität steigern kann. Dazu sollte zunächst die alleinige Wirkung von IGF-1 geprüft werden, daraufhin mit zusätzlichem Hitzeimpuls.

Ablauf

Die Zellen wurden zunächst mit IGF-1 (300ng/ml) inkubiert. Nach einem Reaktions-eintritt erfolgte die Stimulation mittels Hitze.

Es dauerte durchschnittlich $102.5 \text{ Sek} \pm 19.3 \text{ (n=4) Sek}$ bis es zu einem Anstieg der Leitfähigkeit kam. Es schien, als ob Zellleitfähigkeit nach einem Zeitraum ($152.5 \text{ Sek} \pm 36.1 \text{ Sek}$) ein Plateau erreichte, welches konstant blieb (s. Abbildung 3.19). Daher erfolgte die Stimulation mit erhitzter Extrazellulärlösung und gelöstem IGF-1 ca. 350 Sek nach Anstieg der Leitfähigkeit, um sicher zu sein, dass IGF-1 sein Wirkungsmaximum erreicht hatte.

Als Kontrollwerte wurden die Ströme gewertet, die noch vor Applikation von IGF-1 gemessen wurden. Als IGF-1 Antwort galten die Ströme im Bereich des Plateaus. Zudem wurden die Werte ausgewertet, welche 25 Sekunden nach Hitzeimpuls gemessen wurden.

Ergebnis

Allein IGF-1 führte bereits zu einem deutlichen Anstieg der Leitfähigkeit. Es kam bei einem Ruhewert von $11.6 \pm 2.5 \text{ pApF}^{-1}$ zu einem Anstieg auf $51.3 \pm 12.3 \text{ pApF}^{-1}$ ($p=0.01$ (*))(n=4). Dies entsprach $\Delta J \text{ (pApF}^{-1}) = 39.7 \pm 9.7$.

Durch Hitze konnte die Leitfähigkeit zwar um weitere $\Delta J \text{ (pApF}^{-1}) = 17.1 \pm 0.6$ gesteigert werden, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant im Vergleich zu den IGF-1 Strömen ($p=0.2$ (n.s.)). Dennoch war die Stromantwort auf die Hitze- und IGF-1-Applikation signifikant unterschiedlich vom Ruhewert, mit $p=0.006$ (**) (s. Abbildung 3.21).

Durch einen Vergleich der Ein- oder Auswärtsströme zeigte sich ein analoges Bild. Die Ströme nach IGF-1- oder IGF-1- und Hitzeapplikation waren signifikant unterschiedlich vom Ruhewert (s. Tab. 3.8), miteinander verglichen zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied: Vergleich der Einwärtsströme $p=0.2$; Vergleich der Auswärtsströme $p=0.13$.

Zusammenfassung

Durch IGF-1 konnte die Leitfähigkeit von ARPE19-Zellen gesteigert werden. Diese Steigerung war größer als durch alleinigen Hitzeimpuls. Ein zusätzlicher Hitzeimpuls nach IGF-1 Inkubation führte jedoch zu keinem weiteren Anstieg der Leitfähigkeit.

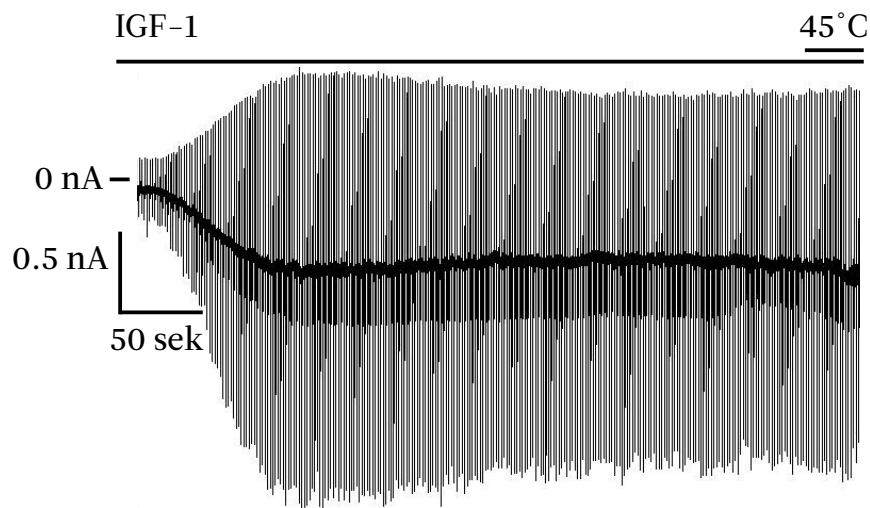


Abbildung 3.19: Untersuchung der Wirkung von Hitze (45°C) und IGF-1 (300ng/ml) auf ARPE19-Zellen unter Verwendung des Rampenprotokolls. Es zeigten sich signifikante Veränderungen der Stromdichten, Haltepotentiale, sowie Umkehrpotentiale. Ebenso ist ein Plateau nach anfänglicher Stromdichtenzunahme zu erkennen.

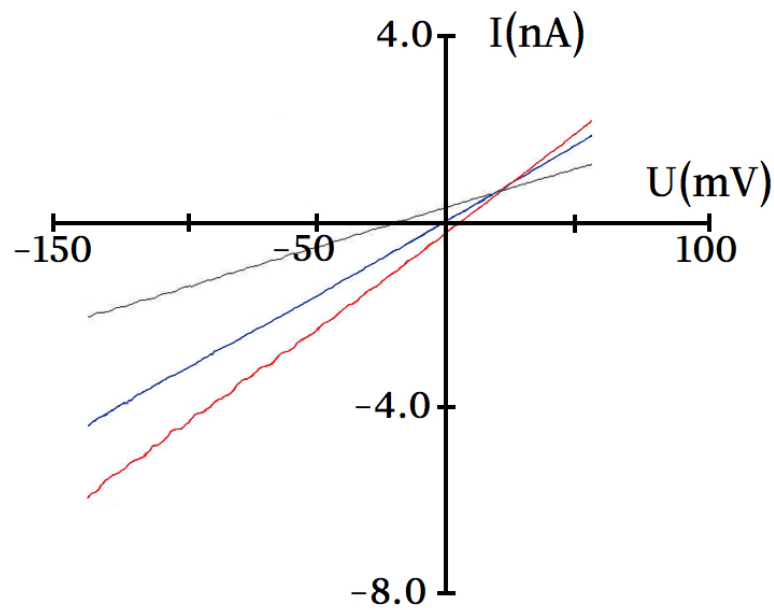


Abbildung 3.20: Strom-Spannungs-Diagramm einer ARPE19-Zelle mit Abbildung des Ruheverlaufs (schwarz), sowie dem Verlauf nach IGF-1 (blau) und zusätzlicher Hitze (rot) Stimulation.

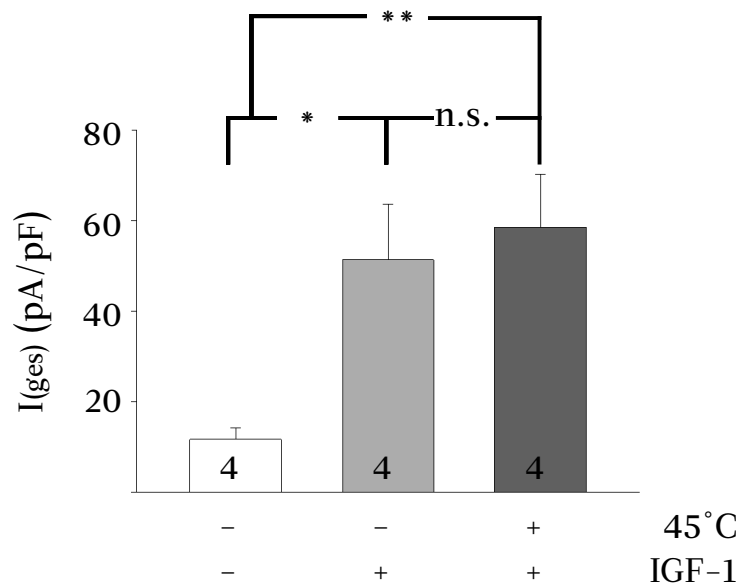


Abbildung 3.21: Vergleich der absoluten Stromdichten in $\text{pA}\cdot\text{pF}^{-1}$, vor und nach Hitzeapplikation mit vorheriger IGF-1 (300ng/ml) Inkubation. Die Balken entsprechen dabei den aus den Versuchen errechneten Mittelwerten mitsamt Standardfehlerabweichung. Die Ziffer innerhalb des Balkens entspricht der Zellzahl, die Beschriftung unterhalb der Balken kennzeichnet die verwendeten Substrate.

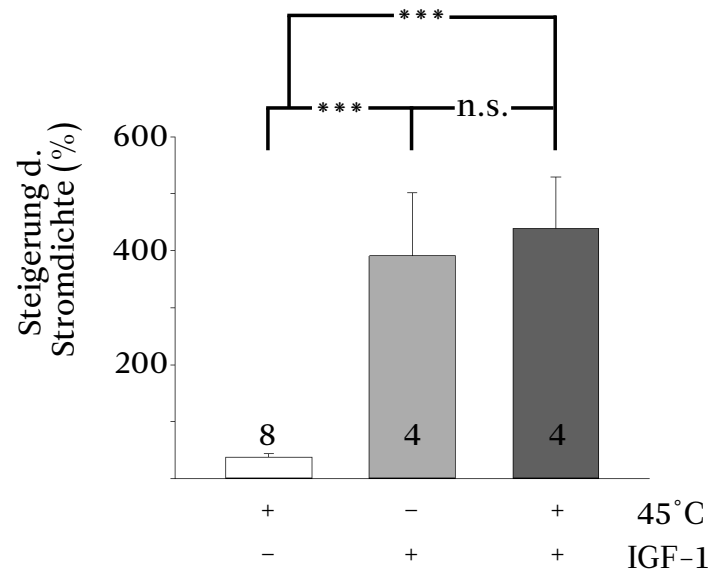


Abbildung 3.22: Vergleich der Steigerung der Stromdichten, vor und nach Hitzeapplikation, mit und ohne vorherige Inkubation von IGF-1. Die Balken entsprechen dabei den aus den Versuchen errechneten Mittelwerten mitsamt Standardfehlerabweichung. Die Ziffer innerhalb des Balkens entspricht der Zellzahl, die Beschriftung unterhalb der Balken kennzeichnet die verwendeten Substrate.

Verwendete Aktivatoren	IGF-1	
		Wärme (45°C)
Anzahl untersuchter Zellen	4	
J_{gesamt} Kontrolle (pApF ⁻¹)	11.6 ± 2.5	
J_{gesamt} Stimulation (pApF ⁻¹)	51.3 ± 12.3	58.4 ± 11.6
Steigerung (%)	391.0 ± 110.6	439.2 ± 89.9
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	39.7 ± 9.7	56.8 ± 9.1
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.01 (*)	0.006 (**)
$J_{einwärts}$ Kontrolle (pApF ⁻¹)	7.9 ± 1.9	
$J_{einwärts}$ Stimulation (pApF ⁻¹)	37.8 ± 9.8	42.1 ± 9.0
Steigerung (%)	445.2 ± 131.2	490.0 ± 113.86
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	29.9 ± 7.8	34.2 ± 7.1
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.01 (*)	0.008 (**)
$J_{auswärts}$ Kontrolle (pApF ⁻¹)	3.9 ± 0.5	
$J_{auswärts}$ Stimulation (pApF ⁻¹)	13.3 ± 2.5	16.3 ± 2.5
Steigerung (%)	323.5 ± 87.9	399.2 ± 68.3
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	9.9 ± 1.9	13.0 ± 2.0
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.009 (**)	0.005 (**)
E_{rev} Kontrolle (mV)	4.2 ± 2.3	
E_{rev} Stimulation (mV)	10.3 ± 2.8	12.5 ± 2.8
$\Delta E_{rev} = E_{Stim.} - E_{Kontr.}$ (mV)	6.1 ± 0.5	8.3 ± 0.5
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.02 (*)	0.03 (*)
J_{hold} Kontrolle (mV)	-57.2 ± 12.5	
J_{hold} Stimulation (mV)	-269.5 ± 117.1	-365.2 ± 114.9
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (mV)	212.2 ± 104.6	308.0 ± 112.4
p-Wert zw. Kontrolle und Stimulation	0.1 (n.s.)	0.05 (n.s.)

Tabelle 3.8: Überblick über Experimente in denen die Wirkung von Hitze (45°C) auf ARPE19-Zellen untersucht wurde nach vorheriger Inkubation mit IGF-1 (300ng/ml). Verwendete Abkürzungen: J_{gesamt} = Gesamtstromdichte; $J_{einwärts}$ = Einwärtsstromdichte; $J_{auswärts}$ = Auswärtsstromdichte; ΔJ = Stromdichtendifferenz; J_{hold} = Haltepotential; "Kontrolle" kennzeichnet den Wert unter Ruhebedingungen, "Stimulation" den Wert nach Substratapplikation; *: p < 0.5; **: p < 0.01; ***: p < 0.001; n.s. = nicht signifikant

3.9 Pharmakologie der IGF-1 induzierten Ströme

Ziel

Auch die durch IGF-1 induzierten Ströme in ARPE19-Zellen sollten hinsichtlich ihrer Pharmakologie charakterisiert werden. Dies sollte zeigen, ob IGF-1 über TRPV2-Kanalaktivität die Zelleitfähigkeit reguliert.

Ablauf

Verwendet wurden die Inhibitoren Ruthenium Rot ($20\mu\text{Mol}$) und SKF96365 ($20\mu\text{Mol}$). Der jeweilige Inhibitor wurde gleichzeitig mit IGF-1 (300ng/ml) inkubiert. Da die durchschnittliche Zeit bis zu einer Stromantwort in den Versuchen aus $3.8 \pm 102.5 \text{ Sek} \pm 19.3 \text{ Sek}$ betrug, wurden die Zellen 300 Sekunden mit den Substanzen inkubiert, bevor sie mit Hitze stimuliert wurden. Hierdurch war das Zeitfenster, in dem die bisherigen Stromveränderungen aufgetreten sind, abgedeckt.

Ergebnis

Beide Inhibitoren unterschieden sich hinsichtlich ihrer Wirksamkeit (s. Tab.3.9).

Ruthenium Rot:

Konnte die Wirkung von IGF-1, sowie IGF-1 und Hitze inhibieren. Es kam zu keinem signifikanten Anstieg der Stromdichte (s. Abbildung 3.23 und 3.25). Erstaunlicherweise führte die Inkubation mit Ruthenium Rot sogar zu einer Abnahme der Gesamtstromdichte $\Delta J \text{ (pApF}^{-1}) = -1.0 \pm 0.6 \text{ (n=4)}$ für IGF-1 und $\Delta J \text{ (pApF}^{-1}) = -1.3 \pm 0.6 \text{ (n=4)}$ für IGF-1 und Hitze. Die Unterschiede blieben verglichen mit den Ruhewerten ohne Signifikanz.

Ebenso blieben die Ein- und Auswärtsströme nahezu unverändert. Lediglich die Auswärtsströme unterschieden sich von den Ruhewerten, nach Inkubation mit IGF-1 und Ruthenium Rot $\Delta J \text{ (pApF}^{-1}) = -0.4 \pm 0.2 \text{ (IGF-1); } p = 0.04 \text{ (*) (n=4)}$. Nach Hitzeapplikation war dieser Unterschied nicht mehr signifikant: $\Delta J \text{ (pApF}^{-1}) = -0.6 \pm 0.3 \text{ (IGF-1 und Hitze); } p = 0.06 \text{ (n.s.) (n=4)}$. Wahrscheinlich wäre durch Erhöhung der Zellzahl auch dieser Wert signifikant geworden.

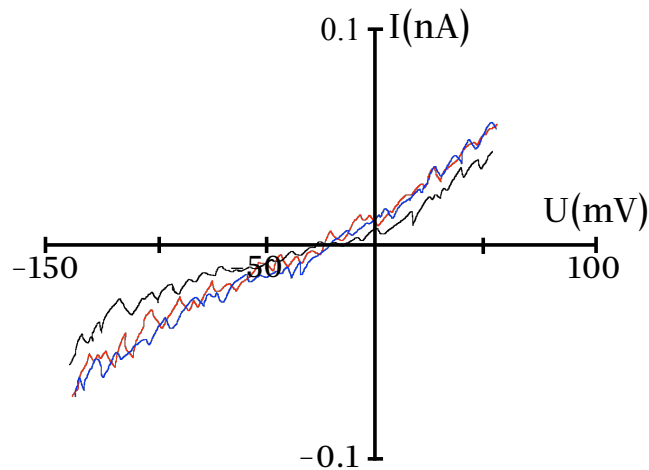


Abbildung 3.23: Strom-Spannungs-Diagramm einer ARPE19-Zelle mit Abbildung des Ruheverlaufs (schwarz), sowie dem Verlauf nach IGF-1 (300ng/ml) und Ruthenium Rot (20 μ Mol)(blau) Inkubation und zusätzlicher Hitze (45°C) (rot) Stimulation.

SKF96365:

Konnte die Wirkung von IGF-1 und Hitze auf ARPE19-Zellen nicht aufheben.

Die Gesamtströme stiegen in den Versuchen um ΔJ (pApF⁻¹) = 1.3 ± 0.3 (n=4); p= 0.01 (*) für IGF-1 und SKF96365. Sowie ΔJ (pApF⁻¹) = 1.9 ± 0.5 ; p= 0.004 (**) (n=4) für IGF-1, Hitze und SKF96365. Ähnliches wiederholte sich bei Analyse der Ein- und Auswärtsstromdichten (s. Tabelle 3.9).

Auch wenn durch SKF96365 keine Inhibition des TRPV2-Stroms möglich gewesen ist, so zeigt sich im Vergleich mit den Ergebnissen aus 3.8, dass SKF96365 die IGF-1 induzierten Ströme reduzieren kann. Wie Abbildung 3.24 und 3.25 verdeutlichen, ist die Steigerung der IGF-1 bzw. IGF-1 und Hitze induzierten Ströme signifikant geringer nach vorheriger Inkubation mit SKF96365. Der Vergleich der Steigerung der Gesamtstromdichten zwischen IGF-1 und IGF-1 mit SKF96365 ($391.0\% \pm 110.6$ (n=4) vs. $21.3\% \pm 5.5$ (n=4)) ergab eine Signifikanz von p= 0.014 (*). Dies beweist, dass SKF96365 die Wirkung von IGF-1 signifikant herabsetzt. Ähnliches zeigte auch der Vergleich der Steigerung der Einwärts- ($439.2\% \pm 89.9$ (n=4) vs. $43.7\% \pm 5.5$ (n=4); p= 0.020) und Auswärtsstromdichten ($323.5\% \pm 87.9$ (n=4) vs. $13.0\% \pm 8.7$ (n=4); p= 0.01).

Ebenso gab es signifikante Unterschiede zwischen den Steigerungen der Stromdichten nach zusätzlicher Hitzeapplikation. Beim Vergleich der Steigerung der Gesamtströme lag p bei 0.004 (**), für die Einwärtsströme bei 0.008 (**) und für die Auswärtsströme bei 0.001 (**).

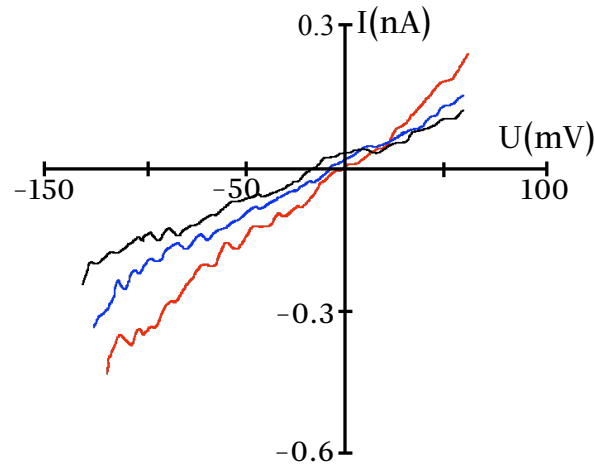


Abbildung 3.24: Strom-Spannungs-Diagramm einer ARPE19-Zelle mit Abbildung des Ruheverlaufs (schwarz), sowie dem Verlauf nach IGF-1 (300ng/ml) und SKF96365 (20µMol)(blau) Inkubation und zusätzlicher Hitze (45°C) (rot) Stimulation.

Zusammenfassung

Durch die beiden Inhibitoren konnte die Wirkung von IGF-1 auf TRPV2-Kanalaktivität zurückgeführt werden. Ruthenium Rot besitzt eine deutlich höhere Wirksamkeit, als SKF96365.

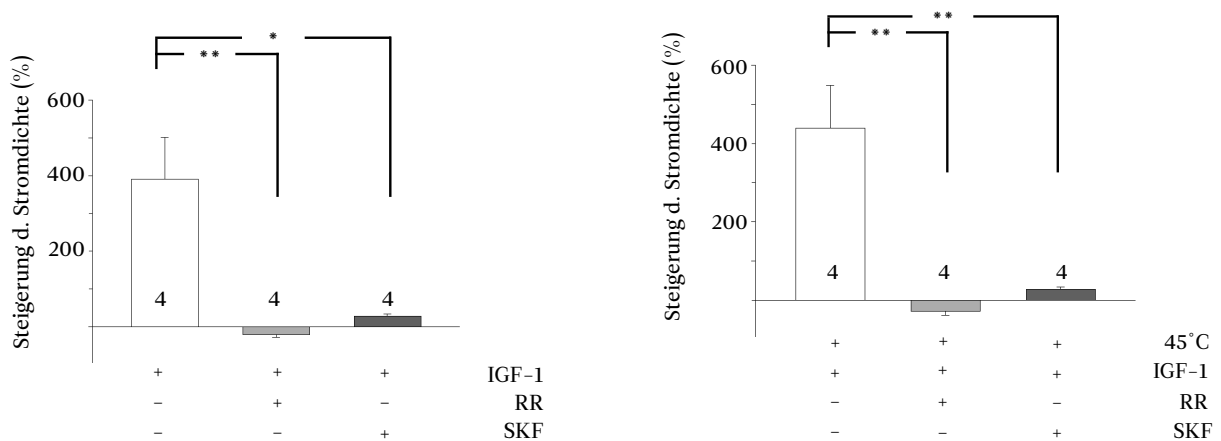


Abbildung 3.25: Vergleich der Steigerung der Stromdichten nach Hitzeapplikation und Inkubation mit IGF-1 , sowie einem der verwendeten Inhibitoren Ruthenium Rot oder SKF96365. Rechts mit zusätzlicher Applikation von Hitze. Die Balken entsprechen dabei den aus den Versuchen errechneten Mittelwerten mitsamt Standardfehlerabweichung. Die Ziffer innerhalb des Balkens entspricht der Zellzahl, die Beschriftung unterhalb der Balken kennzeichnet die verwendeten Substrate.

Verwendete Aktivatoren	IGF-1			
		Wärme 45°C		Wärme 45°C
Verwendete Inhibitoren	Ruthenium Rot		SKF96365	
Anzahl untersuchter Zellen	4		4	
J_{gesamt} Kontrolle (pApF ⁻¹)	3.6 ± 1.1		5.0 ± 0.6	
J_{gesamt} Stimulation (pApF ⁻¹)	2.6 ± 0.5	2.3 ± 0.5	6.4 ± 0.9	6.9 ± 1.1
Steigerung (%)	-20.4 ± 7.3	-29.3 ± 9.2	21.3 ± 5.5	32.7 ± 6.7
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	-1.0 ± 0.6	-1.3 ± 0.6	1.3 ± 0.3	1.9 ± 0.5
p-Wert zw. Kontrolle und Stim.	0.2 (n.s.)	0.3 (n.s.)	0.01(*)	0.004 (**)
$J_{einwärts}$ Kontrolle (pApF ⁻¹)	2.3 ± 1.1		3.2 ± 0.5	
$J_{einwärts}$ Stimulation (pApF ⁻¹)	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.2	4.6 ± 0.6	5.08 ± 0.8
Steigerung (%)	-24.3 ± 18.0	-35.1 ± 14.8	43.7 ± 5.5	55.2 ± 11.0
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	1.2 ± 1.0	1.2 ± 0.9	1.4 ± 0.1	1.7 ± 0.3
p-Wert zw. Kontrolle und Stim.	0.1 (n.s.)	0.4 (n.s.)	0.02 (n.s.)	0.01 (*)
$J_{auswärts}$ Kontrolle (pApF ⁻¹)	1.5 ± 0.7		1.7 ± 0.2	
$J_{auswärts}$ Stimulation (pApF ⁻¹)	1.1 ± 0.5	0.9 ± 0.4	1.8 ± 0.3	2.0 ± 0.3
Steigerung (%)	-21.7 ± 4.3	-23.4 ± 12.4	13.0 ± 8.7	21.2 ± 4.4
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (pApF ⁻¹)	-0.4 ± 0.2	-0.6 ± 0.3	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1
p-Wert zw. Kontrolle und Stim.	0.04 (*)	0.06 (n.s.)	0.01 (*)	0.006 (*)
E_{rev} Kontrolle (mV)	-18.1 ± 8.8		3.6 ± 2.6	
E_{rev} Stimulation (mV)	-23.2 ± 13.4	2.0 ± 19.0	11.3 ± 1.3	11.3 ± 2.4
$\Delta E_{rev} = E_{Stim.} - E_{Kontr.}$ (mV)	5.1 ± 3.5	16.1 ± 11.8	7.7 ± 1.3	7.7 ± 0.2
p-Wert zw. Kontrolle und Stim.	0.6 (n.s.)	0.1 (n.s.)	0.04 (*)	0.02 (*)
J_{hold} Kontrolle (mV)	-16.1 ± 5.8		-23.2 ± 6.2	
J_{hold} Stimulation (mV)	-11.2 ± 6.0	-14.0 ± 5.7	-40.7 ± 4.7	-57.2 ± 2.8
$\Delta J = J_{Stim.} - J_{Kontr.}$ (mV)	4.9 ± 0.2	2.1 ± 0.1	17.5 ± 1.5	34.0 ± 3.4
p-Wert zw. Kontrolle und Stim.	0.2 (n.s.)	0.6 (n.s.)	0.02 (*)	0.01 (*)

Tabelle 3.9: Überblick über Experimente in denen die Wirksamkeit der Inhibitoren Ruthenium Rot und SKF96365 auf Hitze (45°C) und IGF-1(300ng/ml) induzierten Strömen in ARPE19-Zellen untersucht wurde. Verwendete Abkürzungen: Stim. Stimulation; J_{gesamt} = Gesamtstromdichte; $J_{einwärts}$ = Einwärtsstromdichte; $J_{auswärts}$ = Auswärtsstromdichte; ΔJ = Stromdichtendifferenz; J_{hold} = Haltepotential; "Kontrolle" kennzeichnet den Wert unter Ruhebedingungen, "Stimulation" den Wert nach Substratapplikation; *: p < 0.5; **: p < 0.01; ***: p < 0.001; n.s. = nicht signifikant

3.10 Quervergleich Hitze - IGF1

Ziel

Dieser Quervergleich sollte untersuchen, ob es einen Unterschied in der Wirksamkeit der beiden Aktivatoren Hitze und IGF-1 gab.

Methode

Verglichen wurden die Mittelwerte der prozentualen Steigerungen nach Applikation von Hitze oder IGF-1. Dabei wurden jeweils die Steigerungen der Gesamt-, Einwärts- und Auswärtsströme berücksichtigt (s.3.26).

Ergebnis

Der Vergleich der Steigerung der Gesamtströme zeigte, dass IGF-1 deutlich stärker auf die Gesamtstromstärke wirkt als Hitze. Der Unterschied lag im signifikanten Bereich ($p=0.0008$). Gleiches wiederholte sich beim Vergleich der Steigerung der Einwärts- ($p=0.001$) und Auswärtsströme ($p=0.0002$).

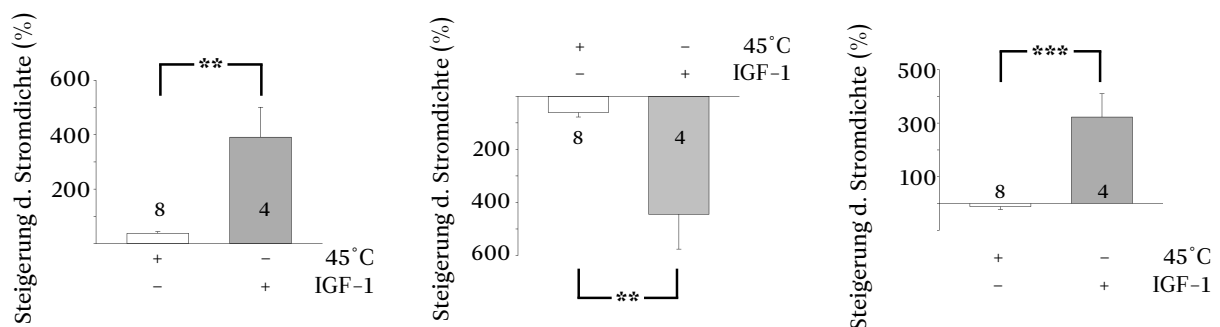


Abbildung 3.26: Vergleich der Stromdichtensteigerung nach Hitze- bzw. IGF-1-Applikation. Die linke Abbildung bildet die Gesamtstromdichten ab, während die mittige die Einwärts- und die rechte die Auswärtsstromdichten darstellt. Die Balken entsprechen dabei den aus den Versuchen errechneten Mittelwerten mitsamt Standardfehlerabweichung. Die Ziffer innerhalb des Balkens entspricht der Zellzahl, die Beschriftung unterhalb der Balken kennzeichnet die verwendeten Substrate.

3.11 Quervergleich IGF1 - Cannabidiol

Ziel

Dieser Quervergleich sollte zeigen, ob die Wirkung von IGF-1 oder Cannabidiol stärker durch Hitze gesteigert werden kann, oder kein Unterschied besteht.

Methode

Verglichen wurden die Mittelwerte der prozentualen Steigerungen nach Applikation von Hitze, nach vorheriger Inkubation mit IGF-1 oder Cannabidiol. Dabei wurden jeweils die Steigerungen der Gesamt-, Einwärts- und Auswärtsströme berücksichtigt (s.3.27).

Ergebnis

Der Vergleich der Steigerung zeigte, dass bezogen auf den Gesamt- und Einwärtsstrom die Hitze einen stärkeren Effekt auf die zuvor mit Cannabidiol inkubierten Zellen besitzt. Die p-Werte lagen bei 0.02 für den Vergleich der Gesamtströme und 0.01 für die Einwärtsströme. In Hinblick auf die Steigerung der Auswärtsströme zeigten sich bei IGF-1 und Cannabidiol keine signifikanten Unterschiede nach Hitzeapplikation.

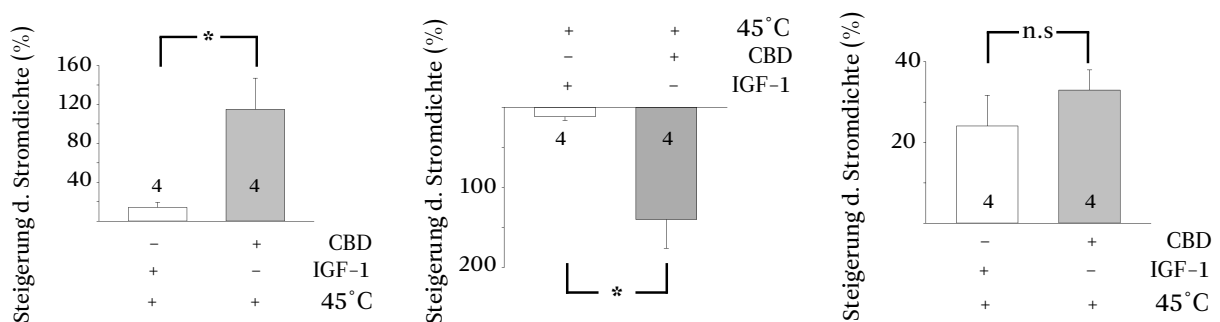


Abbildung 3.27: Vergleich der Stromdichtensteigerung nach Hitze und vorheriger IGF-1 bzw. Cannabidiol Applikation. Die linke Abbildung bildet die Gesamtstromdichten ab, während die mittige die Einwärts- und die rechte die Auswärtsstromdichten darstellt. Die Balken entsprechen dabei den aus den Versuchen errechneten Mittelwerten mitsamt Standardfehlerabweichung. Die Ziffer innerhalb des Balkens entspricht der Zellzahl, die Beschriftung unterhalb der Balken kennzeichnet die verwendeten Substrate.

3.12 Quervergleich LY-Wirkung

Ziel

Dieser Quervergleich sollte zeigen, ob die Hemmung durch LY294002 abhängig ist vom Aktivierungsmechanismus des Kanals. Daher wurde einerseits die Wirkung von LY auf alleinige Hitze, sowie auf Hitze und Cannabidiol, gegenübergestellt.

Methode

Verglichen wurden die Mittelwerte der prozentualen Steigerungen nach Applikation von Hitze und zusätzlich Cannabidiol, nach vorheriger Inkubation mit LY294002. Dabei wurden jeweils die Steigerungen der Gesamt-, Einwärts- und Auswärtsströme berücksichtigt (s.3.28).

Ergebnis

Der Vergleich der Steigerung zeigte, dass bezogen auf den Gesamt- und Einwärtsstrom LY einen stärkeren Effekt auf die zuvor mit Cannabidiol inkubiert Zellen besitzt. Die p-Werte lagen bei 0.01 für den Vergleich der Gesamtströme und 0.03 für die Einwärtsströme. In Hinblick auf die Steigerung der Auswärtsströme zeigten sich bei Hitze und zusätzlichem Cannabidiol keine signifikanten Unterschiede nach Applikation von LY.

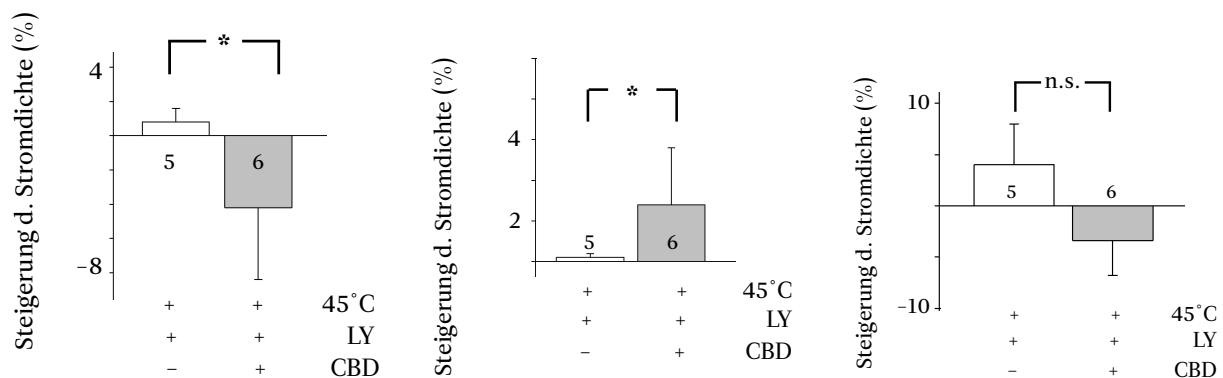


Abbildung 3.28: Vergleich der Stromdichtensteigerung nach LY294002 und vorheriger Hitze bzw. zusätzlicher Cannabidiol Applikation. Die linke Abbildung bildet die Gesamtstromdichten ab, während die mittige die Einwärts- und die rechte die Auswärtsstromdichten darstellt. Die Balken entsprechen dabei den aus den Versuchen errechneten Mittelwerten mitsamt Standardfehlerabweichung. Die Ziffer innerhalb des Balkens entspricht der Zellzahl, die Beschriftung unterhalb der Balken kennzeichnet die verwendeten Substrate.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Untersuchungsziel

TRPV2-Kanäle konnten in humanen retinalen Pigmentepithelzellen nachgewiesen werden. Deren Aktivierung steigert die Sekretion des Wachstumsfaktors VEGF-A durch das retinale Pigmentepithel. Nachweislich sind TRPV2-Kanäle jedoch vor allem im Zytosol der Pigmentzellen lokalisiert (s. Abb. 4.1) [42]. Ziel dieser Arbeit ist es gewesen, die Regulierung der Kanalaktivität von TRPV2-Kanälen zu untersuchen - geschieht dies vor allem durch Oberflächenexpression oder durch Steuerung der Offenwahrscheinlichkeit?

4.2 Vorgehensweise

Zur Beantwortung des Untersuchungsziels wurde schrittweise vorgegangen: Zunächst wurden TRPV2-Kanäle in den verwendeten Kulturen von ARPE19-Zellen nachgewiesen. Dabei wurden die Zellen auf über 45°C erwärmt, da dies ein spezifischer Stimulus für TRPV2-Kanäle ist. Letztlich ist dies ein Kompromiss gewesen: Temperaturen von über 50°C führten zu einer Instabilität des Patches, die zum Abbruch des Versuches führten. Daher wurde eine niedrigere Temperatur gewählt, die dennoch ausreicht um TRPV2-Kanäle zu aktivieren [74, 26, 31]. Um den Effekt, der durch Wärme verursacht wurde, auf TRPV2-Kanäle zurückzuführen, wurden verschiedene Inhibitoren verwendet, die gemeinsam das pharmakologische Profil des-TRPV2-Kanals abbilden: Ruthenium Rot, Lanthan und SKF96365.

Danach wurde mittels drei verschiedener Stimuli die Regulation der TRPV2-Kanäle untersucht. Erwartet werden konnte, dass mittels Hitze lediglich die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle zunimmt. IGF-1 steigert die Oberflächenexpression der Kanäle, unklar war die direkte Aktivierung der Kanäle durch IGF-1. Bisherige Publikationen beschrieben auch durch Cannabidiol eine zunehmende Oberflächenexpression [46].

Jedoch ist in Bezug auf Cannabidiol unklar gewesen, ob auch eine direkte Aktivierung möglich ist. Daher wurde nach Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen Aktivator (IGF-1/CBD) durch einen zusätzlichen Stimulus (Hitze) untersucht, inwieweit die Offenwahrscheinlichkeit zusätzlich gesteigert werden kann.

Abschließend wurde mittels LY29003 geprüft, ob die Mechanismen von einem PI3-Kinase Signalweg abhängig sind. Diese Kinase spielt vor allem bei der Oberflächenexpression eine wichtige Rolle [59, 12, 31].

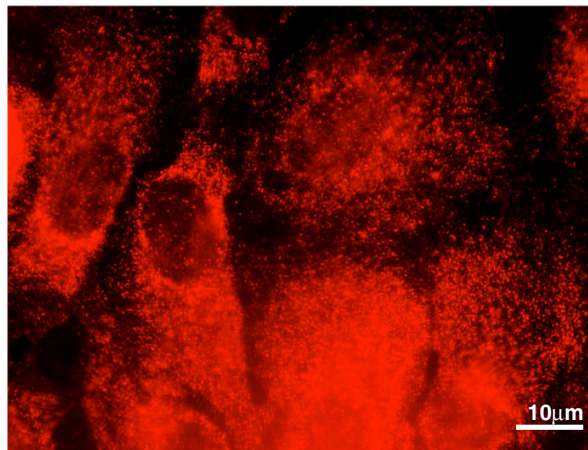


Abbildung 4.1: Immunhistochemische Darstellung der endogenen Expression des TRPV2-Kanals (*rot gefärbt*) in ARPE19-Zellen. Wie die Abbildung zeigt sind die rotgefärbten TRPV2-Kanäle vor allem im Zytosol der Zelle lokalisiert. Skala 10µm. Modifiziert aus [100].

4.3 Einzelergebnisse

Nachweis TRPV2

- Hitze

Zunächst mussten TRPV2-Kanäle in den verwendeten ARPE19-Zellkulturen nachgewiesen werden. Dafür wurden diese mittels Hitze stimuliert, da TRPV2-Kanäle thermosensibel sind und Temperaturerhöhungen einen spezifischen Stimulus darstellen [26]. Da viele der TRP-Kanäle thermosensibel sind [79] musste der Temperaturbereich gewählt werden, der zur Aktivierung von TRPV2-Kanälen führt. Temperaturen $<40^{\circ}\text{C}$ führen vor allem zur erhöhten Offenwahrscheinlichkeit von TRPV-3 und -4 Kanälen. Ab 40°C kommt es zur erhöhten Offenwahrscheinlichkeit von TRPV-1 und -2 Kanälen [74, 26]. Der gewählte Temperaturbereich von durchschnittlich 48.1°C musste demnach zur Aktivierung von TRPV2-Kanälen führen, falls exprimiert.

Durch Erhöhung der Temperatur auf 48.1°C konnte die Membranleitfähigkeit gesteigert werden. Die Gesamtleitfähigkeit stieg dabei um $37.7 \pm 6.3 \%$. Die Einwärtsstromdichte nahm, bei einem Membranpotential von -140mV, um $\delta J = 8.0 \text{ pApF}^{-1}$ zu. Dies reflektiert den Einwärtsstrom positiv geladener Ionen in die Zelle im Sinne einer *inward rectification*. Ähnlich zu Cordeiro et al. [31], die ebenfalls in hRPE/ARPE-Zellen einen derartigen Einwärtsstrom messen konnten. Bereits beim Haltepotential von -40mV nahm, nach Stimulation durch Hitze, der Strom um $\delta J = -0.8 \pm 0.2 \text{ nA}$ ab. Dies war ebenso auf den Einstrom positiv geladener Ionen zurückzuführen. Auch Cordeiro et al. [31] kamen zu ähnlichen Ergebnissen.

Die bereits von Caterina et al. [21] beschriebene Zunahme des Auswärtsstromes blieb in diesen Versuchen aus. Bei einem Membranpotential von 60mV, nahm die Membranleitfähigkeit sehr geringfügig ab ($\delta J = -0.8 \text{ pApF}^{-1}$). Dabei gilt die *outward rectification* als Charakteristikum des TRPV2-Kanals. Zunächst gilt, dass nicht-selektive Kationen-Kanäle sowohl ein-, als auch auswärts-rektifizierende Eigenschaften besitzen: Sobald sich das Membranpotential vom Ruhepotential entfernt wird es zu einem Ionenstrom kommen, da der Kanal kein spezifisches Ion leitet. Eine Rektifikation ist streng genommen nicht möglich, jedoch wird dieser Begriff zur Beschreibung der Potentialabhängigkeit mit diesen Eigenschaften häufig verwendet. Zudem stimulierten in der Erstbeschreibung des TRPV2-Kanals Caterina et al. HEK293 Zellen ausgehend von einem -40mV Haltepotential bis zu einem Potential von +100mV. Sie beschrieben dabei eine deutliche Zunahme des Auswärtsstromes. Gegebenenfalls wäre in den vorliegenden Versuchen auch ein stärkerer Auswärtsstrom messbar gewesen, hätte man sich im positiven Potentialbereich weiter vom Ruhepotential entfernt.

Für TRPV2-Kanäle gilt, dass das Umkehrpotential bei ~0mV liegt. Das erhaltene (+10.1mV \pm 5.8) entsprach nicht dem, welches für TRPV2-Kanäle zu erwarten gewesen wäre [99, 31, 26]. Diese Abweichung könnte durch die Zusammensetzung der Lösungen erklärbar sein: TRPV2 leitet vor allem Ca^{2+} -Ionen. In den Versuchen war die Konzentration für Ca^{2+} extrazellulär doppelt so hoch (1mM), wie intrazellulär (0.5mM). Folglich ist auch ein positiveres Umkehrpotential zu erwarten gewesen. Auch Caterina et al. erhielten in ihren Versuchen mit asymmetrischer Konzentration für Ca^{2+} in HEK293 Zellen, für Ca^{2+} ein E_{rev} von +6,5mV. Die verschiedenen Eigenschaften, die aus den Stromantworten ablesbar gewesen sind (Umkehrpotential, Strom-Spannungsverhältnis etc.), sind mit der Aktivität von TRPV2-Kanälen, wie sie im heterologen Expressionssystem beschrieben wurden, vereinbar gewesen. Da eine Temperaturerhöhung auf >40°C auch andere Ionenkanäle aktivieren kann, bspw. TRPV1 Kanäle, musste man die Beteiligung anderer Ionenkanäle ausschließen:

Die Beteiligung von K^+ -Kanälen konnte durch eine kaliumfreie Zusammensetzung der Pipetten- und Badlösung ausgeschlossen werden. Folglich war die erhöhte Leitfähigkeit nach Wärmeimpuls auf die Aktivität von Kationen- oder Cl^- -Kanälen zurückführen gewesen [119, 56, 129, 70, 54, 31]. Durch die Lage des Umkehrpotentials ist die Wahrscheinlichkeit einer Beteiligung von Cl^- -Kanälen gering gewesen: Da die Verteilung der Cl^- -Konzentration asymmetrisch gewesen ist (intrazellulär > extrazellulär), wäre bei einer Beteiligung von Cl^- -Kanälen ein negatives Umkehrpotential zu erwarten gewesen, oder eine signifikante Verschiebung des Umkehrpotentials in negative Richtung. Ebenso war die Beteiligung weiterer TRPV-Kanäle (bspw. TRPV3 und -4) unwahrscheinlich, da diese bei deutlich niedrigeren Temperaturen aktiv werden (TRPV3 bei $>30^\circ C$, TRPV4 bei $>24^\circ C$ [25]).

Dass Hitze TRPV2-Kanäle aktiviert, war bekannt. Caterina et al. [21] gelang es erstmalig den TRPV2-Kanal zu beschreiben, indem sie Hitze als Stimulus verwendeten. Jedoch gab es folgende Unterschiede: (1) Caterina et al. verwendeten ein heterologes Expressionssystem, da sie entweder HEK293 Zellen oder *Xenopus* oocytes mit VRL-1 cRNA transfizierten. Nachteilig an diesem System war, dass die posttranslationale Modifikation nicht gleichzusetzen ist mit der eines homologen Expressionssystem. (2) Sie legten als Grenzwert für die Stimulation der TRPV2-Kanäle ca. $52^\circ C$ fest. Folglich wäre die hier verwendete Temperatur von durchschnittlich $48.1^\circ C$ zu gering für die Aktivierung von TRPV2-Kanälen gewesen. Weitere Publikationen zeigten, dass auch geringere Temperaturen zu einer Aktivierung von TRPV2-Kanälen führen können. Bspw. wiesen Cordeiro et al. [31] erstmalig TRPV2-Kanäle in ARPE19-Zellen nach und verwendeten dabei durchschnittliche Temperaturen von $45^\circ C$. Liu et al. [74] konnten durch repetitive Stimulation mit Hitze sogar zeigen, dass die Aktivierungsschwelle für TRPV2-Kanäle variabel ist. Demnach war auch die hier verwendete Temperatur von durchschnittlich $48.1^\circ C$ hoch genug für die Aktivierung von TRPV2-Kanälen in ARPE19-Zellen.

- **Pharmakologie**

Zwar sprachen das vorliegende Strom-Spannungsverhältnis und die positive Stromantwort für eine Wirkung des Hitzeimpulses auf die Aktivität von TRPV2-Kanälen. Aber nicht nur TRPV2-Kanäle reagieren auf Wärme, sondern auch andere Ionenkanäle wie z.B. TRPV1 und Anoctamin-1 [126, 23]. Durch Untersuchung der Wirksamkeit verschiedener Inhibitoren konnte untermauert werden, dass die Leitfähigkeitszunahme nach Hitzeimpuls auf TRPV2-Kanalaktivität zurückzuführen war. Drei verschiedene Inhibitoren wurden hierfür verwendet:

(1) Ruthenium Rot, ein unspezifischer Hemmstoff für TRP-Kanäle und Ryanodin-Rezeptoren [34, 77, 8, 1, 132, 26].

(2) Lanthan, ebenso ein unspezifischer Hemmstoff für TRP-Kanäle, hemmt neben diesem auch andere Ca^{2+} -Kanäle [69, 26, 31, 11]. Im Vergleich zu Ruthenium Rot wirkt es in manchen Zelltypen (z.B. DRG Neurone aus Ratten) aktivierend auf TRPV1 und hemmend auf TRPV2-Kanäle [71].

(3) SKF96365, ein Hemmstoff mit geringer Breite im Wirkungsprofil und vornehmlicher Affinität für TRPV2. Da andere Ionenkanäle, die durch SKF96365 gehemmt werden, nicht im RPE exprimiert werden, kann die Substanz als recht spezifisch für die Anwendung im RPE gesehen werden [58, 25]. Dies bestätigten Barro-Soria et al. [4]: Der Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} in Schweine-RPE Zellen, ausgelöst durch Angiotensin II, konnte durch SKF96365 in gleicher Weise, wie durch TRPV2-siRNA-Knockdown, unterdrückt werden. Folglich scheint SKF96365 ein sehr spezifischer Hemmstoff für TRPV2-Kanäle im RPE zu sein.

Zunächst verhinderte Ruthenium Rot eine Leitfähigkeitszunahme durch Hitze. Ruthenium Rot wirkt jedoch auf diverse TRPV-Kanäle (1-6; s. [25]). Auch Lanthan verhinderte eine Leitfähigkeitszunahme durch Hitze, besitzt jedoch, ähnlich wie Ruthenium Rot, ein sehr breites Wirkungsspektrum. Da bspw. die Aktivität von TRPV1-Kanälen im angewandten Temperaturbereich möglich gewesen wäre, wurde SKF96365 verwendet, welches spezifisch auf TRPV2 wirkt, nicht aber auf TRPV1 im RPE. Ähnlich zu Ruthenium Rot und Lanthan hemmte SKF96365 die Leitfähigkeitszunahme. Das pharmakologische Profil an wirksamen Antagonisten entsprach dem der TRPV2-Kanäle, wodurch deren Aktivität bestätigt werden konnte [25, 26, 126].

Erstaunlicherweise führten die Inhibitoren sowohl in Bezug auf die Gesamt-, Einwärts- und Auswärtsstromdichte zu einer Reduktion der Leitfähigkeitszunahme. Bspw. kam es in den Versuchen von Cordeiro et al. [31] an hRPE/ARPE19-Zellen zu keiner Reduktion der Leitfähigkeit durch Ruthenium Rot, bei positiven Membranpotentialen.

Interessant war die unterschiedliche Wirksamkeit der angewendeten Pharmaka: Während Ruthenium Rot die Leitfähigkeitszunahme reduzierte, führten Lanthan und SKF96365 zu einer Abnahme der Leitfähigkeit unter den Ausgangswert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass TRPV2 in ARPE19-Zellen konstitutiv aktiv ist. Dies könnte auch erklären, weshalb bereits eine Temperaturerhöhung zur Leitfähigkeitszunahme führt. Durch Inkubation mit Lanthan oder SKF96365 wird nicht nur verhindert, dass durch die erhöhte Temperatur TRPV2-Kanäle aktiv werden, sondern auch bereits aktive Kanäle werden blockiert.

Zusätzlich könnte die unterschiedliche Wirksamkeit der Inhibitoren durch fol-

gende Faktoren beeinflusst werden:

- Die verschiedenen Pharmaka haben unterschiedlich starke Affinität zu TRPV2-Kanälen
- Die Wirkstärke der Pharmaka ist konzentrationsabhängig

4.4 Regulationsmechanismen

Nachdem die Aktivität von TRPV2-Kanälen in ARPE19-Zellen nachgewiesen werden konnte, zielten die folgenden Experimente darauf ab, die eigentliche Frage nach der Regulation der Kanäle zu beantworten. Mittels drei verschiedener Stimuli (Hitze, IGF-1, Cannabidiol) wurde untersucht, ob die Regulation der Kanäle von der Oberflächenexpression oder Steuerung der Offenwahrscheinlichkeit abhängig ist. Dabei galt die Antwort auf den Hitzepuls als direktes Maß für die aktiven Kanäle in der Membran.

Wirkung von IGF-1

Bereits 1999 gelang es Kanzaki et al. [59] nachzuweisen, dass TRPV2-Kanäle in CHO- und MIN6-Zellen nach Stimulation mit IGF-1 in intrazellulären Vesikeln gespeichert, in die Zellmembran translozieren. Gleiches konnte nun auch von Reichhart et al. [100] für TRPV2-Kanäle in ARPE19-Zellen gezeigt werden (s. 4.2). Daher schien IGF-1 in der nächsten Versuchsreihe ein geeigneter Stimulus zu sein, um TRPV2-Kanäle hinsichtlich der Regulation der Oberflächenexpression zu untersuchen (s. Abbildung 4.3): Zunächst führte IGF-1 auch in den verwendeten ARPE19-Zellen zu einem Anstieg der Zelleitfähigkeit. Dieser konnte durch einen weiteren Hitzeimpuls nicht weiter gesteigert werden. Dies könnte durch Folgendes erklärbar sein: (1) Zunächst steigert IGF-1 die Oberflächenexpression von TRPV2-Kanälen. (2) Zusätzlich kommt es zur vermehrten Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle durch IGF-1, daher nimmt die Leitfähigkeit auf zweierlei Wegen auch deutlich zu. (3) Durch den zusätzlichen Hitzeimpuls kann die Leitfähigkeit nicht weiter gesteigert werden. Dies könnte bedeuten, dass durch IGF-1 bereits ein Großteil der TRPV2-Kanäle in der Membran aktiviert worden ist.

Erneut musste gezeigt werden, dass dieser Leitfähigkeitsanstieg auf die Aktivität von TRPV2-Kanälen zurückzuführen war. Die Stromeigenschaften aus den Versuchen nach IGF-1 Inkubation stimmten mit denen nach Stimulation mittels Wärme überein (s. 4.3). Bei stark negativen Membranpotentialen kam es zu einem starken Einstrom positiv geladener Ionen. Ebenso fiel bei einem Haltepotential von -40mV eine deutliche Negativierung des Haltestromes auf ($\delta J = -212.2 \pm 104.6 \text{ nA}$). Die Umkehrpotentiale lagen ebenso bei $10.3 \pm 2.8 \text{ mV}$ (s. Erläuterung 4.3). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte erneut vermutet werden, dass TRPV2-Kanäle beteiligt sein müssen. Daher wurde in

den nächsten Versuchen, durch Abbildung des pharmakologischen Profils des TRPV2-Kanals, die gemessene Aktivität auf diesen zurückgeführt.

- Pharmakologie

Um das pharmakologische Profil des TRPV2-Kanals abzubilden, wurden in zwei weiteren Versuchsreihen Ruthenium Rot und SKF96365 verwendet. Die Ergebnisse unterschieden sich deutlich voneinander: Durch Ruthenium Rot konnte die Wirkung von IGF-1 gehemmt werden. Auch ein zusätzlicher Hitzeimpuls konnte, nach Inkubation mit Ruthenium Rot, die Leitfähigkeit nicht steigern. Ebenso wenig unterschieden sich die Haltepotentiale im Vorher-Nachher-Vergleich. Erstaunlicherweise konnte diesmal durch Ruthenium Rot die Grundleitfähigkeit der Zellen unter den Ausgangswert gesenkt werden. In den vorherigen Versuchen ist dies mit SKF96365 und Lanthan ebenfalls möglich gewesen. Erneut bestätigt dies den Hinweis auf die konstitutive Aktivität der TRPV2-Kanäle. Zusammenfassend erwies sich Ruthenium Rot als sehr wirksamer Inhibitor. Da Ruthenium Rot ein sehr breites Wirkungsspektrum hat und so die Aktivität von bspw. TRPV1-Kanälen nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde im nächsten Schritt SKF96365 verwendet. Dieser ist spezifischer für TRPV2-Kanäle, als Ruthenium Rot. Trotz Inkubation mit SKF96365 kam es durch IGF-1/Hitze zu einem signifikanten Anstieg der Gesamt-, Ein- und Auswärtsstromdichte. Prozentual nahm die Gesamtstromdichte um $21.3 \pm 5.5\%$, die Einwärtsstromdichte um $43.7 \pm 5.5\%$ (nicht signifikant) und die Auswärtsstromdichte um $13.0 \pm 8.7\%$ zu. Verglichen dazu, war die prozentuale Zunahme der Gesamt-, Ein- und Auswärtsstromdichte nach alleiniger Inkubation mit IGF-1 deutlich größer (s. Ergebnisse 3.9). Daher wurden die Ergebnisse nach IGF-1/Hitze Stimulation mit denen nach vorheriger Inkubation mit SKF96365 verglichen. Dies geschah mittels ungepaartem t-Test: Dieser ergab, dass die Zunahme der Leitfähigkeit nach Inkubation mit IGF-1 und SKF96365 signifikant geringer war, als nach alleiniger IGF-1 Inkubation. Gleiches wiederholte sich beim Vergleich der Werte nach zusätzlichem Hitzeimpuls. Damit war die Wirksamkeit von SKF96365 und gleichzeitig die Aktivität von TRPV2-Kanälen bestätigt (s. Ergebnisse 3.9).

Möglicherweise war die Konzentration von SKF96365 noch zu gering, um bereits im Vorher-Nachher-Vergleich eine signifikante Hemmung der IGF-1 Wirkung zu erzielen. Interessant wäre eine Versuchsreihe, in der aufsteigende Konzentrationen von SKF96365 verwendet werden. So könnte die Konzentration bestimmt werden, ab der es durch SKF96365 bereits im Vorher-Nachher-Vergleich zu einer signifikanten Hemmung kommt. In einer weiteren Versuchsreihe, ähnlich zu [31], könnte der Beweis mittels TRPV2-si-RNA-Knockdown erhärtet werden. Pottosin et al. [96] untersuchten in Jurkat T-Zell Lymphoblasten TRPV2-Kanäle

hinsichtlich ihrer Mechanosensitivität. In ihren Patch-Clamp Versuchen verwendeten sie ebenfalls Ruthenium Rot und SKF96365 als Inhibitoren. Dabei verwendeten sie eine andere Konzentrationen für SKF96365, als in diesen Versuchen. Sie führten jeweils eine Versuchsreihe durch mit einer SKF96365 Konzentration von 50 μ Mol und 250 μ Mol. Die Konzentration für Ruthenium Rot lag ebenfalls bei 20 μ Mol. Mit Ruthenium Rot konnten sie eine signifikante Hemmung erreichen und einen Leitfähigkeitsanstieg unterdrücken. Mit SKF96365 konnte erst mit einer Konzentration von 250 μ Mol ein Leitfähigkeitsanstieg blockiert werden, 50 μ Mol sind nicht ausreichend gewesen. Die hier verwendete Konzentration ist deutlich geringer gewesen (20 μ Mol), möglicherweise hätte eine höhere Konzentration zu einer signifikanten Hemmung im Vorher-Nachher-Vergleich geführt.

In ARPE19-Zellen untersuchten Cordeiro et al. [31] TRPV2-Kanäle mittels IGF-1. Sie wiesen einen Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} , ausgelöst durch Inkubation mit IGF-1, nach. Dies konnte durch Inkubation mit Ruthenium Rot (20 μ Mol) gehemmt werden.

Auch in diesem Fall konnte belegt werden, dass die Wirkung von IGF-1 auf TRPV2-Kanäle durch Ruthenium Rot gehemmt werden kann. Aus den vorliegenden Versuchen geht zusätzlich hervor, dass auch SKF96365 zu ähnlicher Hemmung führt. Die Ergebnisse bestätigen, dass TRPV2-Kanäle in ARPE19-Zellen durch IGF-1 aktiviert werden können.

Über welche Mechanismen reguliert IGF-1 die Aktivität von TRPV2-Kanäle?

Fraglich war, ob IGF-1 vor allem über vermehrte Oberflächenexpression oder direkte Aktivierung auf TRPV2-Kanäle wirkt. Der Quervergleich zu den Versuchen mit reiner Hitzestimulation zeigte, dass es alleinig durch IGF-1 zu einer größeren Leitfähigkeitszunahme kommt, als durch Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit durch Hitze (s. Ergebnisse 3.10). Demnach muss die Regulation der TRPV2-Kanäle durch IGF-1 komplexer sein, als eine alleinige Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit:

Bereits Kanzaki et al. [59] konnten für CHO- und MIN6 Zellen zeigen, dass TRPV2-Kanäle nach einem Stimulus mit IGF-1 von intrazellulär in die Zellmembran translozieren. In weiteren Publikationen konnte dieser Mechanismus ebenfalls nachgewiesen werden [65, 66, 41]. Später konnten Reichhart et al. [100] für ARPE19-Zellen zeigen, dass TRPV2-Kanäle nach Stimulation mit IGF-1 von intrazellulär in die Zellmembran translozieren (s. Abbildung 4.2).

Unklar war, ob IGF-1 nur durch Steigerung der Oberflächenexpression oder auch durch Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit TRPV2-Kanäle reguliert. Daher wurden die Zellen in diesen Versuchen, nach Inkubation mit IGF-1 und Zunahme der Leitfähigkeit, zusätzlich mit Hitze stimuliert. Dies führte zu keinem signifikanten Leitfähig-

keitsanstieg. Die Leitfähigkeitszunahme nach Hitzeimpuls war ein indirektes Maß dafür, wie viel aktive TRPV2-Kanäle sich in der Zellmembran befinden und daher durch Hitze aktiviert werden können. Da nach Inkubation mit IGF-1 keine weitere signifikante Leitfähigkeitszunahme durch Hitzeimpuls meßbar gewesen ist, ist davon auszugehen, dass durch Stimulation mit IGF-1 bereits ein Großteil der Kanäle in der Membran aktiviert worden ist. Für den Effekt von IGF-1 bedeutet dies, dass es nicht nur die Oberflächenexpression der TRPV2-Kanäle, sondern auch die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle erhöht.

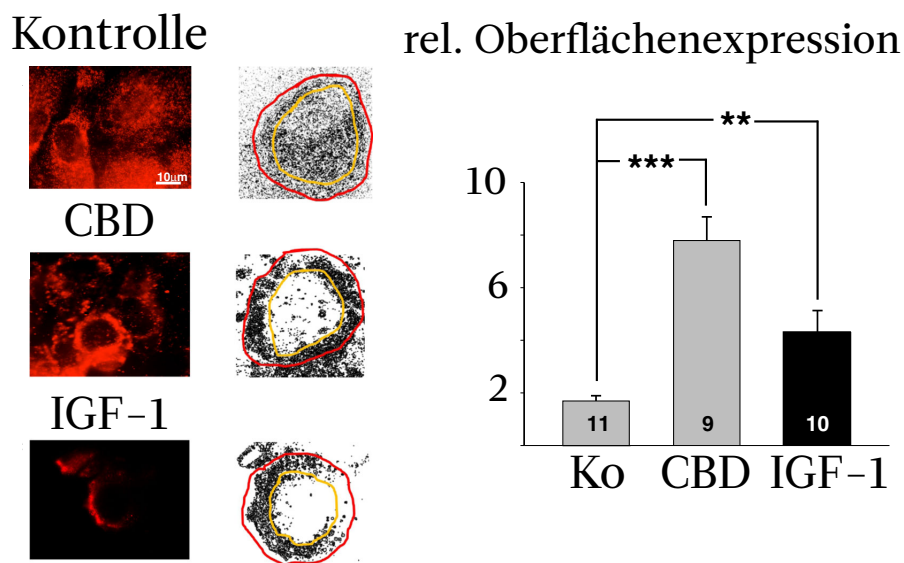


Abbildung 4.2: Auf der linken Seite Abbildungen der konfokalen Mikroskopie von ARPE19-Zellen: Die Kontrolle zeigt den unstimulierten Zustand, die folgenden Abbildungen den Zustand nach Stimulation mit Cannabidiol (CBD) oder IGF-1. Nach Stimulation mit Cannabidiol oder IGF-1 waren mehr TRPV2-Kanäle an der Zelloberfläche nachzuweisen. Der Anteil an TRPV2-Kanälen in der Zellmembran war nun höher als im Zytoplasma. Die rote Linie kennzeichnet die Außenseite der Zelle, während der gelbe Kreis den Intrazellulärraum beschreibt. Aus den Anzahl der Pixel innerhalb der jeweiligen Kreise konnte dann die quantitative TRPV2 Expression berechnet werden: $(\sum \text{Pixel innerhalb des roten Kreises} - \sum \text{Pixel innerhalb des gelben Kreises}) / \sum \text{Pixel innerhalb des roten Kreises}$. Das Ergebnis ist rechts als Diagramm dargestellt. Ko = Kontrolle, CBD= Cannabidiol; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ns: nicht signifikant; Modifiziert aus [100].

Wirkung von Cannabidiol

Bisogno et al. [10] untersuchten bereits 2001 die Wirkung von Cannabinoiden auf TRP-Kanäle. Dabei untersuchten sie nicht nur die Wirkung von Cannabidiol, sondern auch einiger Derivate, wie bspw. (+)-Cannibidiol, auf HEK293 Zellen. Diese waren zuvor mit TRPV1-cDNA transfiziert worden und exprimierten folglich diesen Kanal. Durch Inkubation mit Cannabidiol, sowie durch sein rechtsdrehendes Enantiomer, stieg die intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentration an. Durch Derivate, die bspw. anstatt der C-7 Methylgruppe eine Carboxy- oder Hydroxymethylgruppe trugen, konnten TRPV1-Kanäle nicht derartig stimuliert werden. Später folgten die Versuche von Neer et al. [86]. Diese transfizierten HEK293 Zellen mit humaner- oder ratten-TRPV2-DNA. Unter anderem wurde dann die Wirkung von Δ^9 -Tetrahydrocannabidiol auf diese untersucht. Dabei führte Δ^9 -Tetrahydrocannabidiol zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration, gemessen durch Ca^{2+} -Imaging. Dies war der erste Nachweis für die Aktivierung von TRPV2-Kanälen durch Cannabinoide. Später untersuchten Qin et al. [97] die Wirkung weiterer Cannabinoide auf TRPV2-Kanäle. Dafür verwendeten sie ebenfalls HEK293 Zellen, die nach Transfektion entweder humane- oder Ratten-TRPV2-Kanäle exprimierten. Durch Ca^{2+} -Imaging wurden die intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen, nach Inkubation mit den jeweiligen Cannabinoiden, gemessen. Als Referenz galten dabei Messungen, die mit dem TRPV2-Aktivator 2-APB durchgeführt worden. Erstaunlicherweise konnte die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch Cannabidiol am stärksten gesteigert werden. Der Wert für die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) lag für Cannabidiol bei lediglich $3.7\mu\text{M}$, während sie für 2-APB bei $10.0\mu\text{M}$ lag.

Später konnten die Vermutungen, dass TRPV2-Kanäle durch Cannabidiol aktiviert werden, durch die Veröffentlichungen von Nabissi et al. [85], sowie Hassan et al. [46], erhärtet werden. Letztere untersuchten Mikrogliazellen (BV2- und HAPI-Zellen). In diesen führte Cannabidiol zu einem vermehrten intrazellulären Ca^{2+} Einstrom durch TRPV2-Kanäle. Ebenso konnten sie mittels immunzytochemischen Färbungen eine Translokation von TRPV2-Kanälen vom Zytosol in die Zellmembran, nach Stimulation mit Cannabidiol, messen. Demnach scheint Cannabidiol geeignet zu sein, um TRPV2-Kanäle in ARPE19-Zellen hinsichtlich der Regulationsmechanismen Oberflächenexpression und Offenwahrscheinlichkeit von TRPV2-Kanälen zu untersuchen.

Analog zu den Vorversuchen musste zunächst bestätigt werden, dass auch in ARPE19-Zellen Cannabidiol die Membranleitfähigkeit steigert. Durch Cannabidiol ist es zum Leitfähigkeitsanstieg in ARPE19-Zellen gekommen. In ersten Versuchen ist ein Anstieg der Membranleitfähigkeit nach Inkubation mit Cannabidiol nach ~ 240 Sekunden eingetreten.

Hinsichtlich der Dauer bis zum Wirkungseintritt decken sich diese Versuche mit den Ergebnissen von Barro-Soria et al. [4]. Sie untersuchten Schweine-RPE Zellen und maßen das intrazelluläre freie Ca^{2+} nach Inkubation mit $15\mu\text{M}$ Cannabidiol. Nach ungefähr 300 Sekunden stellten sie einen reversiblen Anstieg an intrazellulärem freiem Ca^{2+} fest. Die maximale intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration lag nach 750-1000 Sekunden vor.

Qin et al. [97] untersuchten die Wirkung von Cannabidiol ($10\mu\text{M}$) auf HEK293 Zellen mit Hilfe von zwei verschiedenen Versuchsmethoden. Zunächst konnte mittels Ca^{2+} -Imaging gezeigt werden, dass nach ungefähr 325 Sekunden das freie zytosolische Ca^{2+} ansteigt. In Patch-Clamp Versuchen ist es jedoch bereits nach wenigen Sekunden (<40 Sekunden) eine Leitfähigkeitszunahme festzustellen gewesen. Wieder andere Ergebnisse erbrachten die Versuche von Hassan et al. [46]: $10\mu\text{M}$ Cannabidiol führten bereits nach <50 Sekunden zu einem Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} in BV2-Microgliazellen oder HADI-Zellen. Die maximale intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration war nach ~ 100 Sekunden messbar. Die Daten lassen wohl damit erklären, dass die Offenwahrscheinlichkeit oder Translokation der TRPV2-Kanäle in den verschiedenen Zelllinien/Expressionsystemen, nach Inkubation mit Cannabidiol, unterschiedlich schnell eintreten. Auch Qin et al. stellten eine deutliche zeitliche Differenz fest: In den Patch-Clamp Versuchen (<40 Sekunden) ist deutlich vor Anstieg des freien zytosolischen Ca^{2+} (~ 325 Sekunden) ein Leitfähigkeitsanstieg messbar gewesen - in beiden Versuchen verwendeten sie HEK293 Zellen. Hier hat insbesondere die Versuchsmethode einen Einfluss auf den Zeitpunkt des messbaren Wirkungseintritts: In Patch Clamp Versuchen scheint ein Leitfähigkeitsanstieg früher messbar zu sein, als ein intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg in der Fluoreszenzmessung. Dies kann unter anderem auf die Verteilung des Ca^{2+} innerhalb der Zelle zurückgeführt werden: Ausgelöst durch einen bestimmten Stimulus (bspw. Hitze, Hormone etc.) kommt es zu einem Einstrom von Ca^{2+} in den submembranalen Raum der Zelle. Dort liegt zunächst lokal eine hohe Konzentration von Ca^{2+} vor, die weitere Ca^{2+} -abhängige Signalwege aktiviert. Später diffundiert das eingeströmte Ca^{2+} in das gesamte Zytosol. Die lokal hohe Konzentration an Ca^{2+} nimmt demnach im Verlauf ab und erhöht die Konzentration des gesamten zytosolischen Ca^{2+} [9]. Allerdings kann durch Fluoreszenzfarbstoffe (bspw. Fura-2) nur das im gesamten Zytosol vorliegende Ca^{2+} gemessen werden. Daher kann (bspw. durch Patch-Clamp) der ursprüngliche Leitfähigkeitsanstieg durch einen Ca^{2+} -Einstrom deutlich früher gemessen werden, als der Anstieg des gesamten intrazellulären Ca^{2+} durch Fluoreszenz.

Durch die lange Inkubationsdauer kam es oft zur Instabilität/Leak des Patches und folglich zum Abbruch des Versuches. Um konstantere Messwerte zu erzielen, wurde der Versuchsablauf folgendermaßen verändert: Die Zellen wurden erst gepatcht, nachdem sie mehrere Sekunden (120-180 Sekunden) mit Cannabidiol inkubiert wurden.

Nach 300 Sekunden wurden sie einer Temperaturerhöhung ausgesetzt. Da so die Ruheleitfähigkeit nicht bestimmt werden konnte, konnte nicht untersucht werden, ob es alleinig durch Cannabidiol bereits zur Zunahme der Leitfähigkeit gekommen war.

Die Inkubation mit Cannabidiol und spätere Temperaturerhöhung führte zur signifikanten Zunahme der Membranleitfähigkeit in ARPE19-Zellen. Da die Ruheleitfähigkeit, bzw. die Leitfähigkeit der Zellen ohne Einfluss von Cannabidiol, nicht bestimmt werden konnte, mussten die gemessenen Werte mit den Versuchen mit alleiniger Temperaturerhöhung verglichen werden. Nur so konnte untersucht werden, ob Cannabidiol die Leitfähigkeit zusätzlich erhöht. Der Vergleich ergab, dass es nach vorheriger Inkubation mit Cannabidiol zur signifikant größeren Leitfähigkeitszunahme kommt, als durch alleinige Temperaturerhöhung. Damit war erwiesen, dass Cannabidiol die Leitfähigkeit von ARPE19-Zellen steigert. Dabei scheint Cannabidiol vor allem die Anzahl der Kanäle in der Plasmamembran zu steigern: Zunächst konnte durch die Temperaturerhöhung die Kanalaktivität gesteigert werden. Daher müssen auch nach Inkubation mit Cannabidiol, Kanäle mit geringer Offenwahrscheinlichkeit in der Zellmembran verblieben sein. Diese konnte dann durch den Temperaturerhöhung gesteigert werden.

Analog zu den anderen Versuchen musste die Leitfähigkeitszunahme auf TRPV2-Kanalaktivität zurückgeführt werden. Die Stromeigenschaften entsprachen denen nach Stimulation mit Wärme (s. 4.3). Bei negativen Membranpotentialen kam es zu einem starken Einstrom positiv geladener Ionen. Ebenso fiel beim Haltepotential von -40mV eine deutliche Negativierung des Haltestromes auf ($\delta I = -386.4 \pm 135.0 \text{ nA}$). Die Umkehrpotentiale lagen wieder im positiven Bereich bei $13.2 \pm 4.4 \text{ mV}$ (s. Abschnitt 4.3). Diese Ergebnisse bekräftigten wieder, dass die Leitfähigkeitszunahme auch auf TRPV2-Kanäle zurückzuführen sein kann. Wieder sollte das pharmakologische Profil des TRPV2-Kanals diese Hypothese untermauern.

- Pharmakologie

SKF96365 - Um den Leitfähigkeitsanstieg der ARPE19-Zellen auf TRPV2-Kanäle zurückzuführen, wurde der Inhibitor SKF96365 ($20 \mu\text{M}$) verwendet. Dieser ist unter den bisher verwendeten und gemäß des Expressionsprofils der TRP-Kanäle im RPE, der spezifischste für TRPV2-Kanäle [31]. Da der Versuchsablauf variiert wurde (s.o.), konnte die Ruheleitfähigkeit nicht bestimmt werden. Daher wurden diese Ergebnisse mit den Ergebnissen nach Inkubation mit Cannabidiol und Temperaturerhöhung verglichen. Erstaunlicherweise unterdrückte SKF96365 nicht nur die Leitfähigkeitszunahme durch Cannabidiol und der Temperaturerhöhung, sondern reduzierte die Leitfähigkeit unter den Ausgangswert ($-2.4 \pm 8.6\%$). Dies könnte erneut ein Hinweis auf die konstitutive Aktivität des TRPV2-Kanals sein. Durch die Inkubation mit SKF96365 ($20 \mu\text{M}$) kam es weder im Vergleich der Ge-

samtleitfähigkeiten, noch Ein- und Auswärtsstromdichten, nach Inkubation mit Cannabidiol und zusätzlicher Temperaturerhöhung, zu einem signifikanten Unterschied. Auch die Halteströme bei -40mV unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Diese Versuche bestätigen, dass die gemessene Leitfähigkeitszunahme durch Cannabidiol auf TRPV2-Kanäle zurückzuführen ist.

Bisher war dies die erste Untersuchung hinsichtlich der Wirkung von Cannabidiol auf TRPV2-Kanäle in ARPE19-Zellen. Die Wirkung von Cannabidiol auf TRPV2-Kanäle konnte aber bereits in anderen Zelllinien nachgewiesen werden. So zeigten Hassan et al. [46], dass Cannabidiol (10 μ Mol) in BV-2 Microgliazellen nach weniger als 50 Sekunden zu einem TRPV2-abhängigen Ca²⁺ Einstrom führt. Durch SKF96365 (10 μ M) konnte dieser Effekt unterdrückt werden. Barro-Soria [4] untersuchten den Effekt von Cannabidiol (15 μ M) auf primären Schweine-RPE Zellen. Barro-Soria zeigten, dass Cannabidiol-induzierte Ca²⁺-Anstiege durch SKF96365 hemmbar waren. Daraus wurde ebenfalls geschlossen, dass Cannabidiol TRPV2-Kanäle aktivieren kann. Cannabidiol führte ebenfalls zu einem TRPV2-abhängigen Anstieg von intrazellulärem Ca²⁺. Barro-Soria und Hassan verwendeten für die Versuche niedrigere Konzentrationen an Cannabidiol und als Methode Ca²⁺-Imaging. Dennoch schlussfolgerten beide Autoren, dass Cannabidiol zu einer vermehrten Aktivität (bzw. Ca²⁺-Einstrom) von TRPV2-Kanälen führt.

Über welche Mechanismen steigert Cannabidiol die Aktivität von TRPV2-Kanälen?

Auch in Bezug auf Cannabidiol ist offen gewesen, ob dies vor allem über eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit oder vermehrte Oberflächenexpression TRPV2-Kanäle reguliert: Nach Inkubation der ARPE19-Zellen mit Cannabidiol, konnte die Leitfähigkeit der ARPE19-Zellen durch Temperaturerhöhung gesteigert werden. Die Leitfähigkeitszunahme nach Hitzeimpuls war ein Maß dafür, wie viel aktive TRPV2-Kanäle sich in der Zellmembran befinden. Demnach mussten sich nach Inkubation mit Cannabidiol noch inaktive Kanäle in der Zellmembran befinden, sonst wäre nach Temperaturerhöhung kein Leitfähigkeitsanstieg messbar gewesen. Im Vergleich mit den Versuchen, in denen lediglich die Temperaturerhöhung untersucht wurde (s. Ergebnisse 3.2), kam es nach vorheriger Inkubation mit Cannabidiol, zu einer signifikant höheren Leitfähigkeitszunahme, als durch eine alleinige Temperaturerhöhung (s. Ergebnisse 3.5).

Dies bedeutet, dass sich (1) nach Inkubation mit Cannabidiol vermehrt TRPV2-Kanäle in der Plasmamembran befinden müssen und (2) ein Anteil dieser Kanäle inaktiv ist und durch einen weiteren Impuls (Temperaturerhöhung) aktiviert werden kann. Daher scheint Cannabidiol TRPV2-Kanäle vor allem über die Oberflächenexpression zu

regulieren. Hingegen würde, falls Cannabidiol bei allen Kanälen die Offenwahrscheinlichkeit erhöht, ein weiterer Leitfähigkeitsanstieg durch Temperaturerhöhung nicht messbar sein.

Vergleich der Wirkung von Cannabidiol und IGF-1 auf TRPV2-Kanäle

Die Wirkung von IGF-1 auf TRPV2-Kanäle wurde bereits in diversen Zelllinien beschrieben (s.o.). IGF-1 schien dabei die Oberflächenexpression von TRPV2-Kanälen zu steigern. Dieser Mechanismus, sowie die direkte Aktivierung der TRPV2-Kanäle, wurde nun auch in ARPE19-Zellen untersucht. Zusätzlich wurde die Wirkung von Cannabidiol im Vergleich zu IGF-1 auf ARPE19-Zellen untersucht. Durch den Vergleich lassen sich grundlegende Informationen zur TRPV2 Regulation erarbeiten. Durch den Vergleich der beiden Substanzen konnten Unterschiede in der Aktivierung von TRPV2-Kanälen festgestellt werden (s. Abbildung 4.3).

Zunächst steigerte IGF-1 die Leitfähigkeit von ARPE19-Zellen. Durch Temperaturerhöhung konnte diese nicht weiter gesteigert werden. Hingegen konnte nach Inkubation mit Cannabidiol die Leitfähigkeit der ARPE19-Zellen durch Temperaturerhöhung gesteigert werden.

Folglich müssen Cannabidiol und IGF-1 auf unterschiedliche Art und Weise auf TRPV2-Kanäle wirken: Durch IGF-1 scheint sowohl die Offenwahrscheinlichkeit, als auch die Anzahl der TRPV2-Kanäle in der Plasmamembran zuzunehmen. Daher kann durch eine Temperaturerhöhung die Offenwahrscheinlichkeit kaum zusätzlich gesteigert werden. Cannabidiol scheint vor allem die Anzahl der Kanäle in der Plasmamembran zu erhöhen und nur in geringem Maße die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle. Nach Inkubation der ARPE19-Zellen mit Cannabidiol, konnte durch eine darauffolgende Temperaturerhöhung die Leitfähigkeit deutlicher als nach IGF-1 Stimulation erhöht werden.

Um dies besser zu verstehen, dienen die Versuche von Reichhart et al. [100] als Ergänzung: Sie untersuchten mittels konfokaler Mikroskopie die Oberflächenexpression von TRPV2-Kanälen in ARPE19-Zellen (s. Abbildung 4.2). Dafür wurden ARPE19-Zellen mit Cannabidiol oder IGF-1 inkubiert. Nach Fixierung der Zellen, wurden TRPV2-Kanäle mittels fluoreszenten Antikörpern markiert. Nach Berechnung der quantitativen intrazellulären Expression und Oberflächenexpression von TRPV2 konnte, die relative Oberflächenexpression bestimmt werden. Die Auswertung ergab, dass sowohl IGF-1, als auch Cannabidiol, die Oberflächenexpression von TRPV2-Kanälen in ARPE19-Zellen signifikant steigern. Interessant war, dass die relative Oberflächenexpression nach Inkubation mit Cannabidiol doppelt so hoch gewesen ist, wie die relative Oberflächenexpression nach Inkubation mit IGF-1.

Zusammenfassend können Cannabidiol und IGF-1, sowohl Offenwahrscheinlichkeit,

als auch die Anzahl der TRPV2-Kanäle in der Zellmembran steigern. Jedoch führt Cannabidiol vor allem zu einer vermehrten Anzahl der TRPV2-Kanäle in der Zellmembran, während IGF-1 vor allem die Offenwahrscheinlichkeit dieser Kanäle steigert.

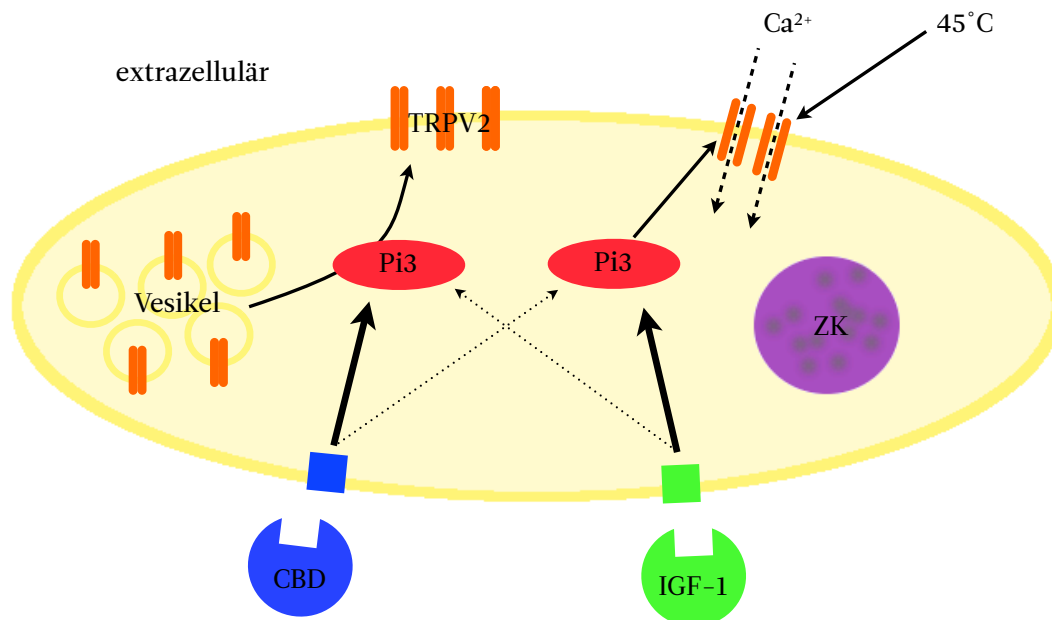


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der verschiedenen Regulationsmechanismen (Oberflächenexpression und Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit) des TRPV2-Kanals. Während IGF-1 vor allem die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle erhöht, führt Cannabidiol vor allem zu einer vermehrten Oberflächenexpression der TRPV2-Kanäle. Abkürzungen: ZK = Zellkern, CBD = Cannabidiol, IGF-1 = Insulin-like growth factor 1, Pi3 = PI3 Kinase Signalweg, Ca^{2+} = Calcium.

PI3 Kinasen

PI3-Kinasen sind Schlüsselenzyme der Signaltransduktion. Über sie werden verschiedene zelluläre Funktionen (Proliferation etc.) reguliert [125]. Auch TRPV2-Kanäle sollen über einen PI3-Kinase abhängigen Mechanismus reguliert werden. Folgende Versuche veranschaulichten dies bereits:

Kanzaki et al. [59] untersuchten die Wirkung von IGF-1 auf CHO-Zellen. Zunächst transfizierten sie CHO-Zellen mit dem Expressionsvektor pcDNA3. Dieser Vektor beinhaltete die gesamte translatierte DNA-Sequenz des GRC-Gens. Nach erfolgreicher Transfektion markierten sie TRPV2-Kanäle mit einem fluoreszenten Antikörper (GRC-Antikörper). Mittels konfokaler Mikroskopie konnten sie die Lokalisation der TRPV2-Kanäle bestimmen. Im Ruhezustand waren diese vor allem im Zytosol konzentriert. Nach 20 minütiger Inkubation mit IGF-1 (2nMol) translozierten TRPV2-Kanäle vom Zytosol in die Zellmembran. In einer weiteren Versuchsreihe inkubierten sie die Zellen zusätzlich mit den PI3-Inhibitoren Wortmannin (100nMol) oder LY294002 (50µMol) und

daraufhin mit IGF-1. Beide Substanzen unterdrückten die Translokation von TRPV2-Kanälen in die Zellmembran durch IGF-1.

Link et al. [73] untersuchten die Aktivierung von TRPV2-Kanälen in Makrophagen. Die Makrophagen isolierten sie aus dem Peritoneum von Mäusen. Sie markierten TRPV2-Kanäle in den isolierten Makrophagen mit Hilfe eines fluoreszenten Antikörpers. Daraufhin inkubierten sie die Makrophagen mit IgG-Antikörper-bedeckten Latex beads. Die Latex beads wurden von den Makrophagen phagozytiert. In den Makrophagen bildeten sich mehrere fluoreszierende Phagosomen aus. Folglich musste dort die Anzahl an TRPV2-Kanälen gestiegen sein. IgG führt, nach Bindung an den entsprechenden Rezeptor, zur Aktivierung des PI3-Kinase Signalwegs [73]. Daher untersuchten sie im nächsten Schritt, ob die vermehrte Rekrutierung der TRPV2-Kanäle um die Phagosomen auf diesen Signalweg zurückzuführen war. Sie wiederholten den Versuch, jedoch wurden die Makrophagen zunächst mit den PI3-Kinase Inhibitoren Wortmannin (100nMol) oder LY294002 (25µMol) inkubiert. Daraufhin konzentrierten sich weniger TRPV2-Kanäle um die Phagosomen. Da sowohl Wortmannin, als auch LY294002 die Aktivität von PI3-Kinasen reduzieren, konnte nachgewiesen werden, dass TRPV2-Kanäle über einen PI3-Kinase Signalweg reguliert werden. Weitere Arbeitsgruppen bestätigten die Aktivierung von TRPV2-Kanälen über den PI3-Kinase Signalweg [115, 93].

Cordeiro et al. [31] konnten erstmals für retinale Pigmentepithelzellen zeigen, dass in diesen TRPV2-Kanäle über einen PI3-Kinase Signalweg reguliert werden: Sie verwendeten ARPE19-Zellen, die sie durch IGF-1 (50 ng/mL) stimulierten. Mittels Ca^{2+} -Imaging wurde untersucht, ob das freie zytosolische Ca^{2+} nach Inkubation mit IGF-1 ansteigt. In der Tat kam es durch die Inkubation mit IGF-1 zu einem deutlichen Anstieg an freiem intrazellulären Ca^{2+} . In der nächsten Versuchsreihe wurden die Zellen zunächst mit LY294002 und daraufhin mit IGF-1 inkubiert. Nach vorheriger Inkubation mit LY294002 (30 µMol) war ein signifikant geringerer Anstieg der intrazellulären freien Ca^{2+} Konzentration messbar. Dies bestätigte, dass auch in retinalen Pigmentepithelzellen TRPV2-Kanäle über einen PI3 Kinase Signalwege reguliert werden.

Unklar ist bisher gewesen, ob auch andere Substanzen (bspw. Cannabidiol, TRPV2-Kanäle) über PI3-Kinase Signalwege regulieren. Dieser Zusammenhang wurde daher näher untersucht (die vorliegenden Ergebnisse werden durch Reichhart et al. [100] ergänzt):

Um dieser Fragestellung nachzugehen, führten wir einerseits Patch-Clamp Versuche durch, in denen wir ARPE19-Zellen verwendeten. Diese wurden entweder mit IGF-1 (300ng/ml) oder Cannabidiol (45 µMol) inkubiert. Um den PI3-Kinase Signalweg zu unterdrücken applizierten wir zuvor LY294002 (30 µMol). Durch eine darauffolgende Temperaturerhöhung sollte die Offenwahrscheinlichkeit der TRPV2-Kanäle erhöht werden und ein etwaiger Anstieg der Membranleitfähigkeit meßbar sein. Erstaunli-

cherweise ist in beiden Fällen die Zunahme der Membranleitfähigkeit nach zusätzlicher Inkubation mit LY204002 signifikant geringer gewesen, als ohne Inkubation mit LY294002 (s. Abbildung 4.5). Dies zeigt, dass IGF-1 und Cannabidiol über einen PI3-Kinase Signalweg die Offenwahrscheinlichkeit und/oder Oberflächenexpression von TRPV2-Kanälen steigern. Ob beide Regulationsmechanismen über einen PI3-Kinase Signalweg reguliert werden, ist durch diesen Versuch nicht zu beantworten. Daher führten wir eine weitere Versuchsreihe durch. Durch diese sollte untersucht werden, ob die Oberflächenexpression von TRPV2-Kanälen über den PI3-Kinase Signalweg reguliert werden kann:

Dazu wurden TRPV2-Kanäle in ARPE19-Zellen mit einem fluoreszenten Antikörper (VRL-1 und goat anti-rabbit IgG-Cy3) markiert. Analog zu den Patch-Clamp Versuchen wurden die ARPE19-Zellen mit LY294002 (30 μ Mol) und darauffolgend mit IGF-1 (300ng/ml) oder Cannabidiol (45 μ Mol) inkubiert. Durch konfokale Mikroskopie konnte, die Oberflächenexpression gemessen werden: Die Oberflächenexpression der TRPV2-Kanäle war durch die zusätzliche Applikation des PI3-Kinase Inhibitors LY-294002 signifikant geringer, als ohne die Inkubation mit LY294002 (s. Abbildung 4.5). Sowohl in den mit Cannabidiol, als auch mit IGF-1 inkubierten Zellen. Dies bestätigte, dass IGF-1 und Cannabidiol die Oberflächenexpression von TRPV2-Kanälen über den PI3-Kinase Signalweg steigern können.

Ob auch die Offenwahrscheinlichkeit der TRPV2-Kanäle über einen PI3-Kinase Signalweg reguliert wird, ist noch offen gewesen. Durch die Versuche kann diese Frage z.T. beantwortet werden: In Patch-Clamp Versuchen führte eine Temperaturerhöhung zu einem (TRPV2-abhängigen) Anstieg der Membranleitfähigkeit. Dieser ist auf eine vermehrte Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle zurückzuführen gewesen (s. Ergebnisse 3.2). Um zu untersuchen, ob über einen PI3-Kinase Signalweg die Offenwahrscheinlichkeit der TRPV2-Kanäle beeinflusst werden kann, wurden die ARPE19-Zellen zunächst mit dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 inkubiert. Danach wurde die Temperatur der Badlösung erhöht. Dies führte jedoch zu keinem signifikanten Anstieg der Membranleitfähigkeit. Folglich scheint auch die Offenwahrscheinlichkeit der TRPV2-Kanäle möglicherweise über einen PI3-Kinase Signalweg reguliert zu sein. Jedoch ist ebenfalls möglich, dass lediglich die Zahl der Kanäle in der Zellmembran durch Inkubation mit LY294002 reduziert wird. Dann würde durch eine Temperaturerhöhung die Membranleitfähigkeit nicht derartig gesteigert werden können. Demnach bleibt unklar, auf welche Art der PI3-Kinase Signalweg Einfluss auf die Oberflächenexpression und gleichzeitig die Offenwahrscheinlichkeit der TRPV2-Kanäle hat. Geschieht dies bspw. über direkte Veränderung in der Konformation des Kanals, bspw. durch Phosphorylierung? Oder führt die Aktivierung des PI3-Kinase Signalwegs zu einer vermehrten Translokation vom Zytosol in die Zellmembran? Letzteres scheint in jedem Fall eine Rolle zu spielen: In den bereits erwähnten immunzytochemischen Färbungen

(s. Abbildung 4.5) konnte eine Translokation der TRPV2-Kanäle in die Zellmembran (ausgelöst durch IGF-1 oder Cannabidiol) durch die Inkubation mit LY294002 (PI3-Kinase Inhibitor) reduziert werden. Denkbar wäre, dass TRPV2-Kanäle - abhängig von einem PI3-Kinase Signalweg - stets zwischen Zellmembran und intrazellulären Vesikeln zirkulieren. Wird dieser Signalweg blockiert (bspw. durch LY294002), translozieren die TRPV2-Kanäle überwiegend in das Zytosol. Falls dann mit Hilfe einer Temperaturerhöhung TRPV2-Kanäle aktiviert werden sollen, so kommt es lediglich zu einem geringen Anstieg der Membranleitfähigkeit, da sich die meisten TRPV2-Kanäle im Zytosol befinden (s. Abbildung 4.4).

Letztlich wäre es interessant, den PI3-Kinase Signalweg weiter zu untersuchen. Denn offen bleibt, ob über den PI3-Kinase Signalweg die Offenwahrscheinlichkeit der TRPV2-Kanäle (bspw. durch Phosphorylierung) direkt beeinflusst werden kann. Oder ob die Versuchsergebnisse darauf zurückzuführen sind, dass die Aktivierung des PI3-Kinase Signalwegs zu einer vermehrten Translokation vom Zytosol in die Zellmembran führt. Zudem bleibt unklar, welche Proteine durch PI3 Kinasen phosphoryliert werden. Beispielsweise könnten dies Serin-Theronin-Kinasen (Akt and PDK1), Tyrosin-Kinase (Tec-Familie), Adaptorproteine (GAB-1) etc. sein [18]. Dies könnte in Zukunft von Bedeutung sein, falls spezifisch auf die Aktivität der TRPV2-Kanäle Einfluss genommen werden soll.

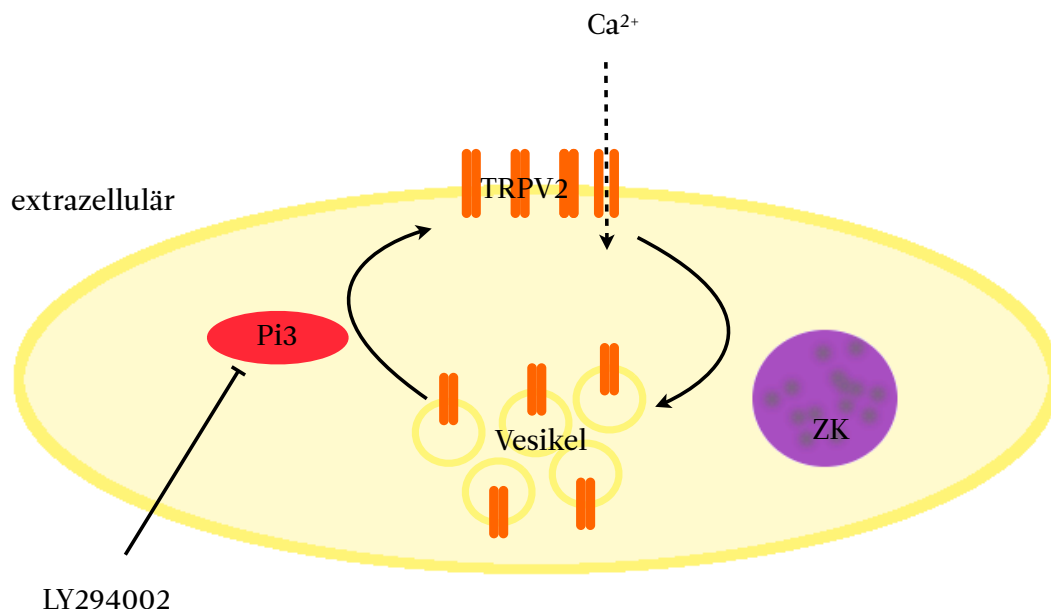


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des zuvor beschriebenen Zirkulierens des TRPV2-Kanals zwischen Zellmembran und intrazellulären Vesikeln. Über den PI3-Kinase Signalweg kommt es vor allem zur Translokation der TRPV2-Kanäle in die Membran. Über LY294002 kann dieser Signalweg herabreguliert werden.

Abkürzungen: ZK = Zellkern, Pi3 = PI3 Kinase Signalweg, Ca^{2+} = Calcium, LY = LY294002.

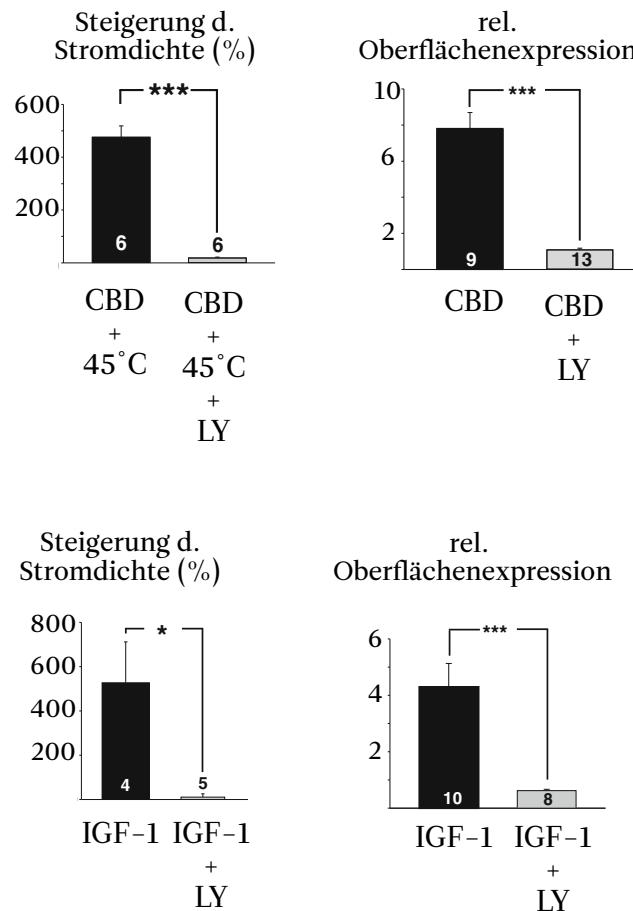


Abbildung 4.5: (links) Darstellung der Leitfähigkeitszunahme (%) durch Cannabidiol/IGF-1 und Hitze, mit und ohne Inkubation von LY294002. Cannabidiol/IGF-1 und Hitze führten zu einer deutlichen Leitfähigkeitszunahme (schwarzer Balken), durch LY294002 konnte dies unterdrückt werden (grauer Balken). (rechts) Darstellung der relativen Oberflächenexpression durch Cannabidiol/IGF-1, mit und ohne Inkubation von LY294002. Die Oberflächenexpression nahm durch Hemmung des PI3 Kinase Signalwegs durch LY294002 deutlich ab. CBD = Cannabidiol; Die Ziffern innerhalb/über den Balken geben die Zellzahl (n) an; *: $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant. Modifiziert aus [100].

Zusammenfassung

Zusammenfassend regulieren IGF-1 und CBD TRPV2-Kanäle sowohl über die Oberflächenexpression, als auch die direkte Aktivierung. IGF-1 scheint vor allem über die direkte Aktivierung TRPV2-Kanäle zu regulieren, während CBD vor allem die Oberflächenexpression von TRPV2-Kanäle steigert. Sowohl die Oberflächenexpression, als auch die direkte Aktivierung unterliegen einem PI3-Kinase Signalweg.

4.5 Klinische Vernetzung

Funktion und Regulation von TRPV2 Kanälen hat nicht nur in der klinischen Forschung, sondern auch im klinischen Alltag Bedeutung [100].

Wie bereits in der Einleitung erläutert, sind chorioidale Neovaskularisationen eine der Hauptkomplikationen der altersbedingten Makuladegeneration. Im Tiermodel wird durch Laserkoagulation der Retina die Ausbildung von CNVs provoziert. Die Laserkoagulation der Retina führt zur Ruptur in der Bruch'schen Membran und in der Folge zur Freisetzung von VEGF-A [17, 55, 107]. VEGF-A wird vor allem durch das RPE freigesetzt und führt zum Aussprossen von chorioidalen Blutgefäßen [116, 131, 118, 107, 44]. Bekanntlich unterliegt die Sekretion von VEGF-A durch das RPE der Aktivität von TRPV2-Kanälen [31]. Die hier vorliegende Arbeit impliziert, dass auf zwei verschiedene Arten die Freisetzung von VEGF-A durch das RPE gesteigert werden kann: Einerseits führt die direkte Temperaturerhöhung des RPEs (bspw. durch Laserkoagulation) und andererseits IGF-1 [102, 109, 110, 111] zur Aktivierung von TRPV2-Kanälen und folglich zur Freisetzung von VEGF-A. Auch die therapeutische Wirkung der Lasertherapie ist zum Teil auf die damit verbundene Freisetzung von Wachstumsfaktoren zurückzuführen [31, 35]. Diese Arbeit zeigt, dass durch verschiedene Substanzen, bspw. Cannabidiol und IGF-1, die Temperatursensitivität des RPE moduliert werden kann. IGF-1 spielt ebenfalls bei der Pathogenese der altersbedingten Makuladegeneration eine Rolle, folglich könnten weitere Kenntnisse in diesem Gebiet neue Therapiestrategien eröffnen.

4.6 Zusammenfassung

Das RPE ist von zentraler Bedeutung für die Funktionsfähigkeit der Retina. Es bildet zusammen mit anderen Strukturen die Blut-Retina Schranke und tritt in enge Beziehung mit den Photorezeptoren der Retina. Die physiologische Funktion des RPE ist essenziell für eine normale Sehfunktion. Pathologische Veränderungen können schwerwiegende Folgen für den Sehvorgang haben. Diese treten beispielsweise bei Erkrankungen wie der Retinitis pigmentosa und der altersbedingten Makuladegeneration auf. Bei Letztgenannter hängen die Veränderungen mit einer vermehrten Expression des Wachstumsfaktors VEGF-A zusammen. In der Folge kommt es zur Ausbildung von chorioidalen Neovaskularisation, was wiederum, vor allem nach Einblutungen, zu starken Sehverlusten führen kann. Die Sekretion des Wachstumsfaktors erfolgt vor allem durch das RPE und ist von der Aktivität des Ionenkanals TRPV2 abhängig. Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Fragestellung, wie TRPV2-Kanäle reguliert werden. Das Verständnis der TRPV2-Kanäle soll neue Wege hinsichtlich der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien eröffnen, insbesondere in Bezug auf die Entstehung von CNVs im Zusammenhang mit der altersbedingten Makuladegeneration.

Die vorliegende Arbeit lässt folgende Erkenntnisse zu:

- TRPV2-Kanäle werden sowohl über direkte Aktivierung, als auch über vermehrte Oberflächenexpression reguliert.
- IGF-1 nimmt über die Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit membranständiger TRPV2-Kanäle und über eine vermehrte Oberflächenexpression von intrazellulären TRPV2-Kanälen Einfluss auf die Aktivität der TRPV2-Kanäle.
- Cannabidiol nimmt vor allem über eine vermehrte Oberflächenexpression intrazellulär gespeicherter TRPV2 Kanäle Einfluss auf deren Aktivität. In geringerem Maße auch über direkte Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit von TRPV2-Kanälen.
- Sowohl die Oberflächenexpression, als auch die direkte Aktivierung von TRPV2-Kanälen unterliegen einem PI3-Kinase abhängigen Signalweg.
- Verschiedene Aktivatoren können auf unterschiedliche Weise (über Oberflächenexpression und direkte Aktivierung) auf TRPV2-Kanäle wirken.

Literaturverzeichnis

- [1] R. Amann and C. A. Maggi. Ruthenium red as a capsaicin antagonist. *Life sciences*, 49(12):849–856, 1991.
- [2] Y. Ban and L. J. Rizzolo. Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium. *Developmental Brain Research*, 121(1):89–95, 2000.
- [3] S. Bang, K. Y. Kim, S. Yoo, S.-H. Lee, and S. W. Hwang. Transient receptor potential v2 expressed in sensory neurons is activated by probenecid. *Neuroscience letters*, 425(2):120–125, 2007.
- [4] R. Barro-Soria, J. Stindl, C. Müller, R. Foeckler, V. Todorov, H. Castrop, and O. Strauß. Angiotensin-2-mediated ca^{2+} signaling in the retinal pigment epithelium: role of angiotensin-receptor-associated-protein and trpv2 channel. *PloS one*, 7(11):e49624, 2012.
- [5] S. Beatty, M. Boulton, D. Henson, H. Koh, and I. Murray. Macular pigment and age related macular degeneration. *British Journal of Ophthalmology*, 83(7):867–877, 1999.
- [6] S. Beatty, H.-H. Koh, M. Phil, D. Henson, and M. Boulton. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Survey of ophthalmology*, 45(2):115–134, 2000.
- [7] L. Bergersen, E. Johannsson, M. Veruki, E. Nagelhus, A. Halestrap, O. Sejersted, and O. Ottersen. Cellular and subcellular expression of monocarboxylate transporters in the pigment epithelium and retina of the rat. *Neuroscience*, 90(1):319–331, 1999.
- [8] P. Bernardi, V. Paradisi, T. Pozzan, and G. F. Azzone. Pathway for uncoupler-induced calcium efflux in rat liver mitochondria: inhibition by ruthenium red. *Biochemistry*, 23(8):1645–1651, 1984.
- [9] M. J. Berridge. The am and fm of calcium signalling. *Nature*, 386:759–760, 1997.

- [10] T. Bisogno, L. Hanu, L. De Petrocellis, S. Tchilibon, D. E. Ponde, I. Brandi, A. S. Moriello, J. B. Davis, R. Mechoulam, and V. Di Marzo. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid vr1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British journal of pharmacology*, 134(4):845–852, 2001.
- [11] B. M. Block, W. C. Stacey, and S. W. Jones. Surface charge and lanthanum block of calcium current in bullfrog sympathetic neurons. *Biophysical journal*, 74(5):2278–2284, 1998.
- [12] K. Boels, G. Glassmeier, D. Herrmann, I. B. Riedel, W. Hampe, I. Kojima, J. R. Schwarz, and H. C. Schaller. The neuropeptide head activator induces activation and translocation of the growth-factor-regulated ca^{2+} -permeable channel grc. *Journal of Cell Science*, 114(20):3599–3606, 2001.
- [13] D. Bok. Processing and transport of retinoids by the retinal pigment epithelium. *Eye*, 4(2):326–332, 1990.
- [14] D. Bok. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *Journal of Cell Science*, 1993(Supplement 17):189–195, 1993.
- [15] M. Boulton and P. Dayhaw-Barker. The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye*, 15(3):384–389, 2001.
- [16] M. S. Burns and M. J. Hartz. The retinal pigment epithelium induces fenestration of endothelial cells in vivo. *Current eye research*, 11(9):863–873, 1992.
- [17] P. A. Campochiaro, P. Soloway, S. J. Ryan, and J. W. Miller. The pathogenesis of choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration. *Mol Vis*, 5(11):34–38, 1999.
- [18] L. C. Cantley. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296(5573):1655–1657, 2002.
- [19] W. Cao, J. Tombran-Tink, R. Elias, S. Sezate, D. Mrazek, and J. F. McGinnis. In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(7):1646–1652, 2001.
- [20] M. J. Caterina, M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine, and D. Julius. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653):816–824, 1997.

- [21] M. J. Caterina, T. A. Rosen, M. Tominaga, A. J. Brake, and D. Julius. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, 398(6726):436–441, 1999.
- [22] W. A. Catterall. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annual review of biochemistry*, 64(1):493–531, 1995.
- [23] H. Cho, Y. D. Yang, J. Lee, B. Lee, T. Kim, Y. Jang, S. K. Back, H. S. Na, B. D. Harfe, F. Wang, et al. The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nature neuroscience*, 15(7):1015–1021, 2012.
- [24] D. E. Clapham. Trp channels as cellular sensors. *Nature*, 426(6966):517–524, 2003.
- [25] D. E. Clapham. Transient receptor potential (trp) channels. *Encyclopedia of neuroscience*, 9:1109–1133, 2009.
- [26] D. E. Clapham, L. W. Runnels, and C. Strübing. The trp ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(6):387–396, 2001.
- [27] M. R. Cohen, K. W. Huynh, D. Cawley, and V. Y. Moiseenkova-Bell. Understanding the cellular function of trpv2 channel through generation of specific monoclonal antibodies. *PLoS One*, 8(12):e85392, 2013.
- [28] H. A. Colbert and C. I. Bargmann. Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *c. elegans*. *Neuron*, 14(4):803–812, 1995.
- [29] H. A. Colbert, T. L. Smith, and C. I. Bargmann. Osm-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of neuroscience*, 17(21):8259–8269, 1997.
- [30] K. S. Cole. Mostly membranes. *Annual review of physiology*, 41(1):1–23, 1979.
- [31] S. Cordeiro, S. Seyler, J. Stindl, V. M. Milenkovic, and O. Strauss. Heat-sensitive trpv channels in retinal pigment epithelial cells: regulation of vegf-a secretion. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(11):6001–6008, 2010.
- [32] D. Cosens and A. Manning. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, 224(5216):285–287, 1969.
- [33] D. Dawson, O. Volpert, P. Gillis, S. Crawford, H.-J. Xu, W. Benedict, and N. Bouck. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*, 285(5425):245–248, 1999.

- [34] A. Dray, C. Forbes, and G. Burgess. Ruthenium red blocks the capsaicin-induced increase in intracellular calcium and activation of membrane currents in sensory neurones as well as the activation of peripheral nociceptors in vitro. *Neuroscience letters*, 110(1):52–59, 1990.
- [35] H. Faby, J. Hillenkamp, J. Roider, and A. Klettner. Hyperthermia-induced upregulation of vascular endothelial growth factor in retinal pigment epithelial cells is regulated by mitogen-activated protein kinases. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 252(11):1737–1745, 2014.
- [36] L. Feeney-Burns, E. Hilderbrand, and S. Eldridge. Aging human rpe: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 25(2):195–200, 1984.
- [37] C. Ferrandiz-Huertas, S. Mathivanan, C. J. Wolf, I. Devesa, and A. Ferrer-Montiel. Trafficking of thermotrp channels. *Membranes*, 4(3):525–564, 2014.
- [38] R. Frank. Growth factors in age-related macular degeneration: pathogenic and therapeutic implications. *Ophthalmic research*, 29(5):341–353, 1997.
- [39] G. Frindt, R. B. Silver, E. E. Windhager, and L. G. Palmer. Feedback regulation of na channels in rat cct. ii. effects of inhibition of na entry. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 264(3):F565–F574, 1993.
- [40] P. J. Fuller, F. E. Brennan, and J. S. Burgess. Acute differential regulation by corticosteroids of epithelial sodium channel subunit and nedd4 mrna levels in the distal colon. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 441(1):94–101, 2000.
- [41] P. Gailly. Trp channels in normal and dystrophic skeletal muscle. *Current opinion in pharmacology*, 12(3):326–334, 2012.
- [42] M. Gees, B. Colsoel, and B. Nilius. The role of transient receptor potential cation channels in ca²⁺ signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(10):a003962, 2010.
- [43] L. Girnita, C. Worrall, S.-I. Takahashi, S. Seregard, and A. Girnita. Something old, something new and something borrowed: emerging paradigm of insulin-like growth factor type 1 receptor (igf-1r) signaling regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(13):2403–2427, 2014.
- [44] H. E. Grossniklaus, S. J. Kang, and L. Berglin. Animal models of choroidal and retinal neovascularization. *Progress in retinal and eye research*, 29(6):500–519, 2010.

- [45] G. S. Hageman and L. V. Johnson. Structure, composition and function of the retinal interphotoreceptor matrix. *Progress in retinal research*, 10:207–249, 1991.
- [46] S. Hassan, K. Eldeeb, P. J. Millns, A. J. Bennett, S. P. Alexander, and D. A. Kendall. Cannabidiol enhances microglial phagocytosis via transient receptor potential (trp) channel activation. *British journal of pharmacology*, 171(9):2426–2439, 2014.
- [47] N. Hellwig, N. Albrecht, C. Harteneck, G. Schultz, and M. Schaefer. Homo-and heteromeric assembly of trpv channel subunits. *Journal of cell science*, 118(5): 917–928, 2005.
- [48] J.-C. Henquin. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*, 49(11):1751–1760, 2000.
- [49] B. Hille et al. *Ion channels of excitable membranes*, volume 507. Sinauer Sunderland, MA, 2001.
- [50] P. Hochstrate. Lanthanum mimicks the trp photoreceptor mutant of drosophila in the blowfly calliphora. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 166(2):179–187, 1989.
- [51] M. J. Hogan, J. A. Alvarado, J. E. Weddell, et al. *Histology of the human eye: an atlas and textbook*. Saunders Philadelphia, 1971.
- [52] H.-Z. Hu, Q. Gu, C. Wang, C. K. Colton, J. Tang, M. Kinoshita-Kawada, L.-Y. Lee, J. D. Wood, and M. X. Zhu. 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of trpv1, trpv2, and trpv3. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34):35741–35748, 2004.
- [53] H. Ichikawa and T. Sugimoto. Vanilloid receptor 1-like receptor-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal nervous system. *Neuroscience*, 101(3):719–725, 2000.
- [54] R. Inoue, T. Okada, H. Onoue, Y. Hara, S. Shimizu, S. Naitoh, Y. Ito, and Y. Mori. The transient receptor potential protein homologue trp6 is the essential component of vascular α 1-adrenoceptor-activated ca^{2+} -permeable cation channel. *Circulation research*, 88(3):325–332, 2001.
- [55] T. Ishibashi, Y. Hata, H. Yoshikawa, K. Nakagawa, K. Sueishi, and H. Inomata. Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization. *Graefe’s archive for clinical and experimental ophthalmology*, 235(3):159–167, 1997.

- [56] T. J. Jentsch, V. Stein, F. Weinreich, and A. A. Zdebik. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiological reviews*, 82(2):503–568, 2002.
- [57] J. Jung, J. S. Shin, S.-Y. Lee, S. W. Hwang, J. Koo, H. Cho, and U. Oh. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8):7048–7054, 2004.
- [58] V. Juvin, A. Penna, J. Chemin, Y.-L. Lin, and F.-A. Rassendren. Pharmacological characterization and molecular determinants of the activation of transient receptor potential V2 channel orthologs by 2-aminoethoxydiphenyl borate. *Molecular pharmacology*, 72(5):1258–1268, 2007.
- [59] M. Kanzaki, Y.-Q. Zhang, H. Mashima, L. Li, H. Shibata, and I. Kojima. Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nature cell biology*, 1(3):165–170, 1999.
- [60] B. Katz and S. Thesleff. A study of the ‘desensitization’ produced by acetylcholine at the motor end-plate. *The Journal of physiology*, 138(1):63–80, 1957.
- [61] S. Kellenberger and L. Schild. International union of basic and clinical pharmacology. xci. structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels and the epithelial Na^{+} channel. *Pharmacological Reviews*, 67(1):1–35, 2015.
- [62] G. L. King and K. Suzuma. Pigment-epithelium-derived factor—a key coordinator of retinal neuronal and vascular functions. *New England Journal of Medicine*, 342(5):349–351, 2000.
- [63] M. Kliffen, H. S. Sharma, C. M. Mooy, S. Kerkvliet, and P. T. de Jong. Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *British journal of ophthalmology*, 81(2):154–162, 1997.
- [64] R. Klinke, H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl. *Physiologie*. Georg Thieme Verlag, 2009.
- [65] I. Kojima and M. Nagasawa. Trpv2: A calcium-permeable cation channel regulated by insulin-like growth factors. *TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades*, Boca Raton (FL), 2007.
- [66] I. Kojima and M. Nagasawa. Trpv2. In *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*, pages 247–272. Springer, 2014.
- [67] N. I. Krinsky. Carotenoid protection against oxidation. *Pure and Applied Chemistry*, 51(3):649–660, 1979.

- [68] N. I. Krinsky. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(6):617–635, 1989.
- [69] L. Lacinova. Voltage-dependent calcium channels. *General physiology and biophysics*, 24, 2005.
- [70] P. Launay, A. Fleig, A.-L. Perraud, A. M. Scharenberg, R. Penner, and J.-P. Kinet. Trpm4 is a Ca^{2+} -activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell*, 109(3):397–407, 2002.
- [71] A. Leffler, R. M. Linte, C. Nau, P. Reeh, and A. Babes. A high-threshold heat-activated channel in cultured rat dorsal root ganglion neurons resembles trpv2 and is blocked by gadolinium. *European Journal of Neuroscience*, 26(1):12–22, 2007.
- [72] A. Liapi and J. N. Wood. Extensive co-localization and heteromultimer formation of the vanilloid receptor-like protein trpv2 and the capsaicin receptor trpv1 in the adult rat cerebral cortex. *European Journal of Neuroscience*, 22(4):825–834, 2005.
- [73] T. M. Link, U. Park, B. M. Vonakis, D. M. Raben, M. J. Soloski, and M. J. Caterina. Trpv2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis. *Nature immunology*, 11(3):232–239, 2010.
- [74] B. Liu and F. Qin. Use dependence of heat sensitivity of vanilloid receptor trpv2. *Biophysical journal*, 110(7):1523, 2016.
- [75] P. F. Lopez, B. D. Sippy, H. M. Lambert, A. B. Thach, and D. R. Hinton. Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 37(5):855–868, 1996.
- [76] M. Lu, M. Kuroki, S. Amano, M. Tolentino, K. Keough, I. Kim, R. Bucala, and A. P. Adamis. Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *Journal of Clinical Investigation*, 101(6):1219, 1998.
- [77] C. O. Malécot, V. Bito, and J. A. Argibay. Ruthenium red as an effective blocker of calcium and sodium currents in guinea-pig isolated ventricular heart cells. *British journal of pharmacology*, 124(3):465–472, 1998.
- [78] N. L. Mata, R. A. Radu, R. S. Clemmons, and G. H. Travis. Isomerization and oxidation of vitamin a in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight. *Neuron*, 36(1):69–80, 2002.

- [79] S. Mergler, M. Valtink, S. Takayoshi, Y. Okada, M. Miyajima, S. Saika, and P. S. Reinach. Temperature sensitive transient receptor potential channels in corneal tissue layers and cells. *Ophthalmic research*, 52(3):151, 2014.
- [80] B. Minke and B. Cook. Trp channel proteins and signal transduction. *Physiological reviews*, 82(2):429–472, 2002.
- [81] A. Molleman. *Patch clamping: an introductory guide to patch clamp electrophysiology*. John Wiley & Sons, 2003.
- [82] C. Montell and G. M. Rubin. Molecular characterization of the drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2(4):1313–1323, 1989.
- [83] S. A. Mousa, W. Lorelli, and P. A. Campochiaro. Role of hypoxia and extracellular matrix-integrin binding in the modulation of angiogenic growth factors secretion by retinal pigmented epithelial cells. *Journal of cellular biochemistry*, 74(1):135–143, 1999.
- [84] K. Muraki, Y. Iwata, Y. Katanosaka, T. Ito, S. Ohya, M. Shigekawa, and Y. Imaizumi. Trpv2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circulation research*, 93(9):829–838, 2003.
- [85] M. Nabissi, M. B. Morelli, M. Santoni, and G. Santoni. Triggering of the trpv2 channel by cannabidiol sensitizes glioblastoma cells to cytotoxic chemotherapeutic agents. *Carcinogenesis*, 34(1):48–57, 2013.
- [86] M. P. Neeper, Y. Liu, T. L. Hutchinson, Y. Wang, C. M. Flores, and N. Qin. Activation properties of heterologously expressed mammalian trpv2 evidence for species dependence. *Journal of Biological Chemistry*, 282(21):15894–15902, 2007.
- [87] E. Neher and B. Sakmann. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *A century of Nature: twenty-one discoveries that changed science and the world*, page 224, 2010.
- [88] N. Ogata, L. Wang, N. Jo, J. Tombran-Tink, K. Takahashi, D. Mrazek, and M. Matsumura. Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. *Current eye research*, 22(4):245–252, 2001.
- [89] N. Ogata, M. Wada, T. Otsuji, N. Jo, J. Tombran-Tink, and M. Matsumura. Expression of pigment epithelium-derived factor in normal adult rat eye and experimental choroidal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(4):1168–1175, 2002.

- [90] G. Owsianik, K. Talavera, T. Voets, and B. Nilius. Permeation and selectivity of trp channels. *Annu. Rev. Physiol.*, 68:685–717, 2006.
- [91] S. Patricia Becerra, R. N. Fariss, Y. Q. Wu, L. M. Montuenga, P. Wong, and B. A. Pfeiffer. Pigment epithelium-derived factor in the monkey retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: apical secretion and distribution. *Experimental eye research*, 78(2):223–234, 2004.
- [92] D. Pauleikhoff, F. J. G. M. van Kuijk, and A. C. Bird. Makuläres pigment und altersabhängige makuladegeneration. *Der Ophthalmologe*, 98(6):511–519, Jun 2001. ISSN 1433-0423. doi: 10.1007/s003470170110. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s003470170110>.
- [93] A. Penna, V. Juvin, J. Chemin, V. Compan, M. Monet, and F.-A. Rassendren. Pi3-kinase promotes trpv2 activity independently of channel translocation to the plasma membrane. *Cell calcium*, 39(6):495–507, 2006.
- [94] C. B. Phelps, R. J. Huang, P. V. Lishko, R. R. Wang, and R. Gaudet. Structural analyses of the ankyrin repeat domain of trpv6 and related trpv ion channels. *Biochemistry*, 47(8):2476–2484, 2008.
- [95] R. Planells-Cases and A. Ferrer-Montiel. Trp channel trafficking. *Liedtke WB, Heller S, editors. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades.*, (Chapter 23), 2007.
- [96] I. Pottosin, I. Delgado-Enciso, E. Bonales-Alatorre, M. G. Nieto-Pescador, E. G. Moreno-Galindo, and O. Dobrovinskaya. Mechanosensitive Ca^{2+} -permeable channels in human leukemic cells: Pharmacological and molecular evidence for trpv2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(1):51–59, 2015.
- [97] N. Qin, M. P. Neeper, Y. Liu, T. L. Hutchinson, M. L. Lubin, and C. M. Flores. Trpv2 is activated by cannabidiol and mediates cgrp release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Neuroscience*, 28(24):6231–6238, 2008.
- [98] J. R Sparrow, D. Hicks, and C. P Hamel. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Current molecular medicine*, 10(9):802–823, 2010.
- [99] I. S. Ramsey, M. Delling, and D. E. Clapham. An introduction to trp channels. *Annu. Rev. Physiol.*, 68:619–647, 2006.
- [100] N. Reichhart, S. Keckeis, F. Fried, G. Fels, and O. Strauss. Regulation of surface expression of trpv2 channels in the retinal pigment epithelium. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 253(6):865–874, 2015.

- [101] W. G. Roberts and G. E. Palade. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *Journal of Cell Science*, 108(6):2369–2379, 1995.
- [102] R. Rosenthal, H. Wohlleben, G. Malek, L. Schlichting, H. Thieme, C. B. Rickman, and O. Strauss. Insulin-like growth factor-1 contributes to neovascularization in age-related macular degeneration. *Biochemical and biophysical research communications*, 323(4):1203–1208, 2004.
- [103] R. Rosenthal, G. Malek, N. Salomon, M. Peill-Meininghaus, L. Coeppicus, H. Wohlleben, S. Wimmers, C. B. Rickman, and O. Strauss. The fibroblast growth factor receptors, fgfr-1 and fgfr-2, mediate two independent signalling pathways in human retinal pigment epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 337(1):241–247, 2005.
- [104] R. Rosenthal, H. Heimann, H. Agostini, G. Martin, L. L. Hansen, and O. Strauss. Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells regulate vascular endothelial growth factor secretion rates in health and disease. *Molecular vision*, 13:443, 2007.
- [105] S. J. Royle and R. D. Murrell-Lagnado. Constitutive cycling: a general mechanism to regulate cell surface proteins. *Bioessays*, 25(1):39–46, 2003.
- [106] J. C. Saari. Vitamin a metabolism in rod and cone visual cycles. *Annual review of nutrition*, 32:125–145, 2012.
- [107] R. Schlingemann. Role of growth factors and the wound healing response in age-related macular degeneration. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*, 242(1):91–101, 2004.
- [108] D. Shweiki, A. Itin, D. Soffer, and E. Keshet. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359(6398):843–845, 1992.
- [109] M. G. Slomiany and S. A. Rosenzweig. Autocrine effects of igf-i-induced vegf and igfbp-3 secretion in retinal pigment epithelial cell line arpe-19. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 287(3):C746–C753, 2004.
- [110] M. G. Slomiany and S. A. Rosenzweig. Igf-1-induced vegf and igfbp-3 secretion correlates with increased hif-1 α expression and activity in retinal pigment epithelial cell line d407. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(8):2838–2847, 2004.

- [111] L. E. Smith, W. Shen, C. Perruzzi, S. Soker, F. Kinose, X. Xu, G. Robinson, S. Driver, J. Bischoff, B. Zhang, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nature medicine*, 5(12):1390–1395, 1999.
- [112] M. Y. Song, A. Makino, and J. X.-J. Yuan. Role of reactive oxygen species and redox in regulating the function of transient receptor potential channels. *Antioxidants & redox signaling*, 15(6):1549–1565, 2011.
- [113] F. R. Steele, G. J. Chader, L. V. Johnson, and J. Tombran-Tink. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(4):1526–1530, 1993.
- [114] R. Steinberg. Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Documenta Ophthalmologica*, 60(4):327–346, 1985.
- [115] A. J. Stokes, L. M. Shimoda, M. Koblan-Huberson, C. N. Adra, and H. Turner. A trpv2-pka signaling module for transduction of physical stimuli in mast cells. *The Journal of experimental medicine*, 200(2):137–147, 2004.
- [116] O. Strauss. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews*, 85(3):845–881, 2005.
- [117] O. Strauss, F. Buss, R. Rosenthal, D. Fischer, S. Mergler, F. Stumpff, and H. Thiem. Activation of neuroendocrine l-type channels ($\alpha 1d$ subunits) in retinal pigment epithelial cells and brain neurons by pp60 c-src. *Biochemical and biophysical research communications*, 270(3):806–810, 2000.
- [118] O. Strauss, H. Heimann, M. Foerster, H. Agostini, L. Hansen, and R. Rosenthal. Activation of l-type ca^{2+} channels is necessary for growth factor-dependent stimulation of vegf secretion by rpe cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(13):3926–3926, 2003.
- [119] R. Strotmann, C. Harteneck, K. Nunnenmacher, G. Schultz, and T. D. Plant. Otrpc4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nature cell biology*, 2(10):695–702, 2000.
- [120] R. M. Stroud, M. P. McCarthy, and M. Shuster. Nicotinic acetylcholine receptor and superfamily of ligand-gated ion channels. *Biochemistry*, 29(50):11009–11023, 1990.

- [121] E. Suss-Toby, Z. Selinger, and B. Minke. Lanthanum reduces the excitation efficiency in fly photoreceptors. *The Journal of general physiology*, 98(4):849–868, 1991.
- [122] A. Szallasi. The vanilloid (capsaicin) receptor: receptor types and species differences. *General Pharmacology: The Vascular System*, 25(2):223–243, 1994.
- [123] G. Valenti, G. Procino, G. Tamma, M. Carmosino, and M. Svelto. Minireview: aquaporin 2 trafficking. *Endocrinology*, 146(12):5063–5070, 2005.
- [124] B. W. Van Balkom, P. J. Savelkoul, D. Markovich, E. Hofman, S. Nielsen, P. Van der Sluijs, and P. M. Deen. The role of putative phosphorylation sites in the targeting and shuttling of the aquaporin-2 water channel. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44):41473–41479, 2002.
- [125] I. Vivanco and C. L. Sawyers. The phosphatidylinositol 3-kinase–akt pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2(7):489–501, 2002.
- [126] J. Vriens, G. Appendino, and B. Nilius. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Molecular pharmacology*, 75(6):1262–1279, 2009.
- [127] R. T. Watson, M. Kanzaki, and J. E. Pessin. Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocrine reviews*, 25(2):177–204, 2004.
- [128] J. A. Wells, R. Murthy, R. Chibber, A. Nunn, P. A. Molinatti, E. M. Kohner, and Z. J. Gregor. Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in the vitreous of patients with subretinal neovascularisation. *British Journal of Ophthalmology*, 80(4):363–366, 1996.
- [129] S. Wimmers, M. O. Karl, and O. Strauss. Ion channels in the rpe. *Progress in retinal and eye research*, 26(3):263–301, 2007.
- [130] B. S. Winkler, M. E. Boulton, J. D. Gottsch, and P. Sternberg. Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Molecular vision*, 5:32, 1999.
- [131] A. Witmer, G. Vrensen, C. Van Noorden, and R. Schlingemann. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Progress in retinal and eye research*, 22(1):1–29, 2003.
- [132] L. Xu, A. Tripathy, D. A. Pasek, and G. Meissner. Ruthenium red modifies the cardiac and skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors) by multiple mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 274(46):32680–32691, 1999.

- [133] X.-Z. S. Xu, H.-S. Li, W. B. Guggino, and C. Montell. Coassembly of trp and trpl produces a distinct store-operated conductance. *Cell*, 89(7):1155–1164, 1997.
- [134] G. Yellen. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419(6902):35–42, 2002.

Kapitel 5

Anhang

5.1 Abkürzungsverzeichnis

AKT Proteinkinase B

cAMP cyclisches Adenosinmonophosphat

ARPE19 Adult Retinal Pigment Epithelial Cell Line 19

BV-2 mouse microglial cells, recombinant retrovirus (v-raf/v-mic) transformed

Ca²⁺ Calcium

CBD Cannabidiol

cDNA Complement Deoxyribonucleic Acid

Cl²⁻ Chlorid

CHO Chinese Hamster Ovary

CNV Chorioidale Neovaskularisation

cRNA Complement Ribonucleic Acid

DRG Dorsal Root Ganglion

FGF Fibroblas-growth-factor

FGFR Fibroblas-growth-factor-receptor

FURA-2 Fluoreszenzfarbstoff

GAB1 GRB2-associated-binding protein 1

GLUT Glucose Transporter

cGMP cyclisches Guanosinmonophosphat

HAPI Cells Highly Aggressive Proliferating Rat Microglia

HEK293 Human Embryonic Kidney Cell Line 293

hRPE Humanes retinales Pigmentepithel

IGF-1 insulin like growth factor 1

IgG Immunglobulin G

IP₃ Inositoltriphosphat

J Joule

K⁺ Kalium

MAPK Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase

MIN6 Mouse Insulinoma Cell Line 6

mV Millivolt

PDK-1 Phosphoinositide-dependent kinase-1

PEDF Pigment-epithelium-derived-factor

PKA Proteinkinase A

PKC Proteinkinase C

RPE Retinales Pigmentepithel

siRNA small interfering Ribonucleic Acid

TEC Protein-Tyrosin Kinasen

TCH Δ^9 -Tetrahydrocannabinol

TRPV Transient Receptor Potential Vanilloid

VEGF-A Vascular-endothelial-derived-factor-A

VR-1 Vanilloid receptor subtype 1

VRL-1 Vanilloid receptor-1 like receptor

VEGF-A Vascular Endothelial Growth Factor A

5.2 Danksagung

Dank gilt Prof. Dr. Olaf Strauss für die exzellente Betreuung und Zusammenarbeit. Selbstverständlich gilt der Dank auch der gesamten Arbeitsgruppe, die mich stets unterstützt hat.

5.3 Publikation

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Reichhart, N., Keckeis, S., Fried, F., Fels, G., & Strauss, O. (2015). Regulation of surface expression of TRPV2 channels in the retinal pigment epithelium. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 253(6), 865-874.

5.4 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt

Die Dissertation wurde von Prof. Dr. rer. nat. O. Strauss angeregt und in ihrer Ausarbeitung überwacht.